

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification⁵ : C12N 15/00, 7/00, 5/00 C12P 21/00, 19/30, A61K 39/12 A61K 37/00	A1	(11) International Publication Number: WO 90/13641 (43) International Publication Date: 15 November 1990 (15.11.90)
(21) International Application Number: PCT/US90/02656 (22) International Filing Date: 10 May 1990 (10.05.90) (30) Priority data: 354,171 10 May 1989 (10.05.89) US (60) Parent Application or Grant (63) Related by Continuation US 354,171 (CIP) Filed on 10 May 1989 (10.05.89) (71) Applicant (for all designated States except US): SLOAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH [US/US]; 1275 York Avenue, New York, NY 10021 (US).	(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only) : GILBOA, Eli [US/US]; 147 Boulder Ridge Road, Scarsdale, NY 10583 (US). SULLENGER, Bruce [US/US]; 420 East 70th Street, Apt. 5M, New York, NY 10021 (US). (74) Agent: WHITE, John, P.; Cooper & Dunham, 30 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112 (US). (81) Designated States: AT (European patent), BE (European patent), CA, CH (European patent), DE (European patent), DK (European patent), ES (European patent), FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), NL (European patent), SE (European patent), US. Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(54) Title: STABLY TRANSFORMED EUCARYOTIC CELLS COMPRISING A FOREIGN TRANSCRIBABLE DNA UNDER THE CONTROL OF A POL III PROMOTER (57) Abstract <p>This invention provides a stably transformed eucaryotic cell comprising a pol III promoter and a foreign transcribable DNA, the foreign transcribable DNA being under the control of the pol III promoter. This invention also provides retroviral vector which comprises a chimeric t-RNA introduced into the 3' long terminal repeat (LTR) of the retroviral vector.</p>		

DESIGNATIONS OF "DE"

Until further notice, any designation of "DE" in any international application whose international filing date is prior to October 3, 1990, shall have effect in the territory of the Federal Republic of Germany with the exception of the territory of the former German Democratic Republic.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	ES	Spain	MC	Monaco
AU	Australia	FI	Finland	MG	Madagascar
BB	Barbados	FR	France	ML	Mali
BE	Belgium	GA	Gabon	MR	Mauritania
BF	Burkina Faso	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BG	Bulgaria	GR	Greece	NL	Netherlands
BJ	Benin	HU	Hungary	NO	Norway
BR	Brazil	IT	Italy	RO	Romania
CA	Canada	JP	Japan	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SN	Senegal
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Chad
DE	Germany, Federal Republic of	LU	Luxembourg	TG	Togo
DK	Denmark			US	United States of America

Stably Transformed Eucaryotic Cells Comprising foreign
transcribable DNA under the control of a pol III Promoter

5 This application is a continuation-in-part of United States
application serial number 354,171, filed May 10, 1989, the
contents of which are hereby incorporated by reference into
the present disclosure.

10 Throughout this application various publications are
referred by numbers within parenthesis. Full citations for
these publications may be found at the end of the
specification immediately preceding the claims. The
disclosures of these publications, in their entireties, are
15 hereby incorporated by reference into this application in
order to more fully describe the state of the art to which
this invention pertains.

Background of the Invention

20 The potential of inhibiting the expression of specific genes
in live cells was recently demonstrated using a technique
called antisense RNA (or DNA) inhibition ("antisense
inhibition"). This technique is based on blocking the flow
of genetic information from DNA via RNA to protein, by the
25 introduction into the cells, of a complementary sequence (in
the form of a single stranded RNA or DNA molecule called
antisense RNA or DNA) to a portion of the target RNA.
Through nucleotide base pairing, a duplex is formed which
blocks the expression of the function or the gene encoded in
30 the RNA transcript through one of several possible
mechanisms: degradation of the duplex; inhibition of
translation; or other (11, 22, 37).

-2-

Regulation of gene expression via antisense RNA was first recognized as a naturally occurring mechanism in procaryotes (11). The potential of using complementary sequences to inhibit specific gene functions was demonstrated by Paterson, et al. (28) who used complementary nucleic acids to inhibit the translation of specific mRNA species in vitro. However, it was the pioneering work of Zamecnik and Stephenson (38) who first demonstrated the experimental inhibition of the expression of specific genes in live cells via antisense RNA. This inhibition was accomplished by the use of a synthetic oligonucleotide, complementary to a portion of the Rous sarcoma virus (RSV), to inhibit viral replication in cultured cells.

Inhibition of specific genes using antisense DNA templates (also called antisense genes) was first demonstrated by Pestka (29) and Coleman, et al. (5) in bacteria and later by Izant and Weintraub (16) in eucaryotic cells. This was an important development since antisense DNA templates ("antisense templates") are capable of synthesizing antisense RNA on a continual basis when introduced into the eucaryotic cell and therefore have the potential to exert a long lasting effect on the cell and its progeny.

It is important to distinguish between transient antisense and stable antisense inhibition protocols because each of these protocols achieve different objectives and employ different technologies. Transient antisense inhibition, as the name implies, results in the creation of a temporary state of inhibition in the cell. The use of antisense oligonucleotides, microinjection of antisense RNA or

-3-

transient DNA transfection protocols, and use of SV40 based vectors are examples of protocols by which transient antisense inhibition is accomplished (22).

5

On the other hand, stable antisense RNA inhibition involves the permanent genetic alteration of the cell, achieved by the introduction of antisense templates which persist in the cell and its progeny, by synthesizing antisense RNA on a continual basis. The stable introduction of antisense templates into the cell can be accomplished by using any of several gene transfer techniques. Such techniques for the alteration of cells may involve, but are not limited to: (i) physical methods such as CaPO_4 mediated DNA transfection; (ii) electroporation; or (iii) use of viral vectors such as retroviral vectors. These methods can produce stably altered cells by the insertion of the antisense DNA into the cell chromosome or, via use of viral vectors, such as bovine papilloma virus or Epstein-Barr virus, introduction of the antisense templates will persist in the cell as freely replicating episomes (22).

10
15
20

Stable antisense inhibition

The stable form of antisense RNA inhibition has an enduring effect which creates a constant state of gene inhibition in the host cell and its progeny. It therefore provides a distinct advantage over the use of the transient protocol.

A stable antisense inhibition protocol requires the design of a DNA template which upon transfer to the cell is capable of synthesizing adequate levels of antisense RNA to inhibit

35

-4-

the expression of the target gene. To accomplish this objective, the DNA template must encode an efficient transcriptional unit. A eucaryotic transcriptional unit comprises: (i) a promoter to initiate RNA transcription; (ii) the template of the RNA transcript; and (iii) a third region signalling RNA transcription termination. Three distinct RNA polymerases are known to exist in eucaryotic cells: (a) RNA polymerase I (pol I) which transcribes ribosomal genes; (b) RNA polymerase II (pol II) which is responsible for the expression of the protein coding cellular genes; and (c) RNA polymerase III (pol III) which transcribes the 5S and t-RNA genes.

A stable antisense inhibition protocol also requires an excess of RNA transcripts because antisense RNA inhibition requires the formation of stable duplexes between the antisense RNA and the target RNA. Indeed, several studies have shown that an apparent 30-100 fold excess of antisense RNA is required to obtain a 10-20 fold reduction in gene expression (16, 17, 20 and 26). However, other studies have shown that in some experimental systems a more moderate excess of 3-10 fold may lead to an observable inhibition (4, 21, 25 and reviewed in reference 22).

Therefore, the effectiveness of stable and transient antisense RNA inhibition is determined by the ratio of antisense RNA to sense RNA, which in turn is determined by the efficiency of antisense RNA synthesis from the corresponding DNA template.

The development of effective stable antisense inhibition

-5-

protocols in eucaryotic cells is hampered by the lack of efficient antisense templates that are capable of synthesizing sufficient levels of antisense RNA. The nature of the promoter and its polymerase are of pivotal importance in the design of efficient antisense templates which will produce high levels of antisense RNA in cells stably transduced with the antisense template. So far, pol II based promoters have been used exclusively to generate antisense transcripts in stable antisense inhibition protocols (22).

Pol III based transcriptional units

In an attempt to improve antisense RNA synthesis using stable gene transfer protocols, the use of pol III promoters to drive the expression of antisense RNA can be considered. The underlying rationale for the use of pol III promoters is that they can generate substantially higher levels of RNA transcripts in cells as compared to pol II promoters. For example, it is estimated that in a eucaryotic cell there are about 6×10^7 t-RNA molecules and 7×10^5 mRNA molecules, i.e., about 100 fold more pol III transcripts of this class than total pol II transcripts (39). Since there are about 100 active t-RNA genes per cell, each t-RNA gene will generate on the average RNA transcripts equal in number to total pol II transcripts. Since an abundant pol II gene transcript represents about 1% of total mRNA while an average pol II transcript represents about 0.01% of total mRNA, a t-RNA (pol III) based transcriptional unit may be able to generate 100 fold to 10,000 fold more RNA than a pol II based transcriptional unit.

-6-

Several reports have described the use of pol III promoters to express RNA in eucaryotic cells. Lewis and Manley (23) and Sisodia (34) have fused the Adenovirus VA-1 promoter to various DNA sequences (the herpes TK gene globin and tubulin) and used transfection protocols to transfer the resulting DNA constructs into cultured cells which resulted in transient synthesis of RNA in the transduced cell. De la Pena and Zasloff (6) have expressed a t-RNA-Herpes TK fusion DNA construct upon microinjection into frog oocytes. Jennings and Molloy have constructed an antisense RNA template by fusing the VA-1 gene promoter to a DNA fragment derived from SV40 based vector which also resulted in transient expression of antisense RNA and limited inhibition of the target gene (18).

Common to the above cited studies is that the pol III based DNA templates were introduced into cells using a gene transfer procedure which led only to transient synthesis of pol III driven RNA transcripts in the cell. Furthermore, since the number of active DNA templates present in the transiently transduced cells cannot be determined, the efficiency of pol III based transcription was not and could not have been determined.

It is the objective of this invention to design improved DNA templates which can be stably transferred into the eucaryotic cell and which are capable of synthesizing large quantities of antisense RNA, RNA, or gene product.

-7-

Summary of the Invention

5 This invention provides a stably transformed eucaryotic cell comprising a pol III promoter and a foreign transcribable DNA, the foreign transcribable DNA being under the control of the pol III promoter.

10 This invention also provides a retroviral vector which comprises a chimeric t-RNA introduced into the 3' long terminal repeat (LTR) of the retroviral vector.

15

20

25

30

35

-8-

Description of the Figures

5 Figure 1: Structure of a prototype t-RNA, a human t-RNA^{met} derivative and a chimeric t-RNA gene.

10 Figure 1A shows the structure of a prototype t-RNA gene. A t-RNA gene is 85-95 base pairs long. Two regions designated A and B encode the promoter which directs the initiation of RNA transcription to generate the primary transcript. Termination of transcription is specified by a run of four or more T residues on the sense strand. Arrow indicates that transcription usually terminate after the third T. The primary t-RNA transcript is further processed to remove sequences both from the 5' end and the 3' end as shown, to 15 generate the mature t-RNA transcript. (Additional modifications including addition of CCA and base modifications are not shown). For additional information see the review by Geiduschek, 1988 (9).

20 Figure 1B shows the structure of a human tRNA^{met} derivative 3-5. 3-5 was derived from a cloned human t-RNA gene by deleting 19bp from the 3' end of the gene (1). The truncated gene can be transcribed if a termination signal is provided, however, no processing of the 3' end of the 25 primary transcript takes place.

30 Figure 1C shows a chimeric t-RNA gene. A foreign sequence is fused to the 3' end of t-RNA^{met} 3-5 and a termination signal also is added. Transcription results in the formation of a chimeric RNA species consisting of the t-RNA transcript fused to the foreign sequence.

35

-9-

Figure 2: Sequence of three DNA fragments fused to t-RNA^{met} 3-5.

- 5 Figure 2 shows that the DNA fragments A and B correspond to sequence found in an HIV isolate, right to left, nucleotides 530 to 559 and 5960 to 5989, respectively (33). DNA fragment C corresponds to a sequence found in M-MuLV, nucleotides 1645 to 1674 (31). Additional sequences at the
- 10 5' end of each DNA fragment generate a Sac II "sticky end" as indicated. At the 3' end of each fragment, additional nucleotides are present to generate a t-RNA transcription termination signal and a MluI "sticky ends", as indicated.
- 15 Figure 3: Structure of a retroviral vector containing a chimeric t-RNA gene.

N2 is a retroviral vector derived from M-MuLV, a murine retrovirus, which was previously described (2). The N2

20 vector was first modified by insertion of a 52 bp long polylinker sequence into the NheI site present in the 3'LTR. The polylinker sequence contains five restriction sites which are unique to the N2 plasmid: ApaI, Bgl II, Sna BI, Sac II, and MluI. (14). The t-RNA containing DNA fragment

25 encoded in plasmid 3-5 (as described by Adeniyi-Jones (1)) was excised with Stu I and Bam HI, treated with Klenow fragment to generate blunt ends and cloned into the Sna BI site of the modified N2 vector. The three DNA fragments shown in Figure 2 were cloned into the Sac II and Mu I sites

30 of the polylinker in the N2 vector. The sequences as shown in Figure 2 fused to the 3' end of 3-5 will generate fusion RNA transcripts in which the foreign sequence is

-10-

complementary to HIV RNA (A and B) or M-MuLV (C). N2 vector DNA containing the chimeric t-RNA was converted to corresponding virus using established procedures as described in text (14, 27). Figure 3 also shows that in the infected cell the chimeric t-RNA is duplicated and is present in both LTR's (14). LTR - long terminal repeat; Neo-Neomycin resistance gene; 3-5- tRNA^{met} derivative described in Figure 1B; seq - DNA fragments described in Figure 2; T-Transcription termination signal shown in Figure 2.

Figure 4: RNA blot analysis of cells infected with antisense vectors containing chimeric t-RNAs.

Virus containing chimeric t-RNAs was generated by transfection of packaging cells, PA317, according to established procedures (12, 27). Total cellular RNA was isolated, subjected to electrophoresis in 8% urea-polyacrylamide gels, blotted to nitrocellulose filters and hybridized with a human t-RNA^{met} probe. This probe detects both human and mouse t-RNA^{met} RNA species (13) as well as the chimeric t-RNA transcripts. Panels A, B and C show that two RNA transcripts are detected in uninfected cells (NIH 3T3 panel A and B; HUT 78, panel C). The larger species represents the primary RNA transcript in mouse cells and the shorter species is the mature t-RNA. (Note that the primary transcript in mouse cells is longer than that of the human cells but the size of the mature t-RNA is identical). Cells harboring a chimeric t-RNA contain an additional RNA species which is detected with the t-RNA^{met} probe. This RNA species corresponds in size to the predicted size of the transcripts

-11-

expressed from the corresponding templates (see Figures 2 and 3), and it is of the same size in both human and mouse cells.

5

Panel A shows virus corresponding to DNA construct DCT5A and DCT5B which were used to infect NIH 3T3 cells. G418 resistant colonies were isolated and then pooled for RNA analysis. The variation in intensity of the chimeric t-RNA band is due to the variation in the fraction of cells harboring the correct vector DNA.

10

Panel B shows NIH 3T3 cells infected with virus corresponding to DCT5C. G418 resistant colonies were isolated (C1-C4) and analyzed independently.

15

Panel C shows HUT 78 cells infected with DCT5A virus G418 resistant colonies which were isolated in soft agar (A1-A3) and analyzed independently.

20

Figure 5: Inhibition of M-MuLV replication in NIH 3T3 cells harboring antisense vectors.

Cloned cell lines (10^6 cells per 6 cm plate) harboring the M-MuLV specific antisense vector DCT5C 1, 2 and 4 - (see RNA analysis, Figure 4B) and the parent vector DCT5 without the antisense sequences but containing the 3-5 t-RNA^{met} derivative (DCT5 1, 2) were infected with M-MuLV at a M.O.I. of about 2 and secretion of virus was determined 3 days post infection by measuring R.T. activity in the medium (10).

25

30

35

-12-

Figure 6: Inhibition of viral spread in a culture of NIH 3T3 cells harboring an antisense vector.

5 NIH 3T3 cells and a clonally derived cell line harboring an antisense vector (DCT5C-2, see Figures 4 and 5) were infected with M-MuLV at a M.O.I. of 0.002 (10^6 cells per 6 cm plate). Cells were grown to semiconfluency and split 1:20. At times indicated (days 4, 6, 8 and 11) cells were
10 removed from the plate by light trypsinization and the fraction of cells harboring virus was measured by determining the presence of viral specific envelope on the cell surface using immunofluorescence staining and FACS analysis. Briefly, the trypsinized cells were reacted with
15 a M-MuLV envelope specific monoclonal antibody followed by FITC labelled goat antimouse antibody and sorted on a FACS machine. 10^1 fluorescence units were arbitrarily chosen to distinguish (gate) between negative and positive cells. The upper two panels show that in a culture of NIH 3T3 cells
20 chronically infected with M-MuLV 91.8% cells score as positively infected cells and in a culture of uninfected NIH 3T3 cells only 1.8 score as positive, i.e. constituting the experimental background of this procedure. The lower left panels show that in cultures infected with a low
25 multiplicity of virus (M.O.I. 0.002, i.e. one cell in 5000), virus infection spreads through the culture and after 8 and 11 days, 80% and 90% of cells are infected respectively. In contrast, the panels on the right show that spread of virus in cultures containing antisense vector is significantly
30 inhibited, reaching about 3% and 11% after 8 and 11 days respectively.

35

-13-

Figure 7: Inhibition of HIV replication in HUT 78 cells harboring antisense vectors.

5 HUT 78 cells were infected with DCT5A and DCT5B virus and a control virus (DCA - in which the human ADA minigene was inserted into the 3' LTR of the N2 vector) (14). Two days post-infection, the cells were plated in soft agar in the presence of 0.7 mg/ml G418. Resistant colonies appeared 10-14 days later in cultures infected with the various vectors. Independent colonies were isolated and expanded to cell lines for further use. Expression of the chimeric t-RNA transcripts was determined in the DCT5A containing cell lines (A1-A3) as shown in Figure 4C, but was not determined for the three DCA containing cell lines (control) or for the DCT5B derived cell lines (B1-B4).

Each cell line was infected with HIV (the virus strain used was ARV-2 (31), 10^5 cells per ml of 1:10 dilution of virus) and cells were split 1:5 every three to four days. Presence of HIV in the cell cultures was determined 14 days post HIV infection by measuring the R.T. activity in the various cell lines (average of the three control cell lines is taken as zero inhibition) is indicated for each cell line harboring an antisense vector (A1-A3 and B1-B4). In four cell lines R.T. activity was undetectable (100% inhibition), in two cell lines, A2 and A3, a low level of R.T activity was detected (92% and 82% inhibition, respectively) and in one cell line B3, HIV replication was not inhibited. Since RNA analysis was not performed from DCT5B containing cell lines, the most plausible explanation is that this cell line did not contain or did not express (sufficient levels) of the

-14-

antisense RNA.

5 Figure 8 shows the 60 base pair oligonucleotide encoding the
TAR sequence of the Human Immunodeficiency Virus (HIV).

10 Figure 9 shows inhibition of R.T. activity in TAR "decoy"
containing cells. In this experiment, the ability of HIV to
replicate in cells expressing TAR was compared to cells
which were treated in parallel to contain a similar vector
not expressing TAR.

15 Figure 10 shows inhibition of R.T. activity in TAR "decoy"
containing cells up to 24 days post infection.

20

25

30

35

-15-

Detailed Description of the Invention

5 This invention provides a stably transformed eucaryotic cell, i.e., a cell into which a foreign DNA or RNA fragment was introduced so that the foreign DNA or RNA, or its transcript, or reverse transcript is maintained in the progeny over many generations, comprising a pol III promoter and a foreign transcribable DNA, the foreign transcribable
10 DNA being under the control of the pol III promoter.

The foreign transcribable DNA may be virtually any DNA capable of being transcribed into RNA, regardless of whether such RNA is subsequently translated into a polypeptide for
15 example, the transcribable DNA may encode an RNA capable of acting as a false primer, i.e. a primer for the initiation of reverse transcription; and ribozyme, i.e. an enzyme made of RNA, not protein; an antisense RNA; or an mRNA, including a polypeptide translatable therefrom; or a viral regulatory
20 sequence such as the HIV regulatory sequence designated TAR. The pol III promoter may be any promoter recognized by a pol III RNA polymerase. Examples of pol III promoters useful in the practice of this invention include, but are not limited to, t-RNA pol III promoter, such as human, plant or animal
25 pol III promoters or mutants or derivations including chimeric derivatives thereof, e.g. a human t-RNAi^{met} or the 3-5 derivative thereof. The foreign transcribable DNA under the control of the pol III promoter may be introduced into the cell by any gene transfer method. Such methods may
30 include, but are not limited to, the use of gene transfer vectors, CAPO⁴ mediated DNA transfection or electroporation.

-16-

In one embodiment, the foreign transcribable DNA encodes antisense RNA which is complementary to a segment of an RNA encoded by a pathogen, such as a retrovirus, e.g. the Human Immunodeficiency Virus (HIV) or a bacteria or a parasite. Alternatively, the transcribable DNA may encode an HIV regulatory sequence, such as the regulatory sequence designated TAR to which the HIV regulatory protein designated tat binds, to activate HIV transcription, or the REV recognition signal of HIV.

The foreign transcribable DNA may encode a molecule which inhibits the expression of a gene within the cell such as an endogenous gene or a foreign gene, e.g. a viral or retroviral gene present within the cell. For example, the foreign transcribable DNA may encode a recognition sequence of a regulator of gene expression which acts through binding to a DNA molecule, an RNA molecule, or a regulatory protein, within the cell.

The eucaryotic cell useful in the practice of this invention may be a plant or animal cell, such as a mammalian cell, e.g. a human cell, or chicken cell. The mammalian and human cells may comprise but are not limited to haematopoietic stem cells.

The invention also provides a stably transformed eucaryotic cell comprising a pol III promoter and a foreign transcribable DNA, the transcribable DNA being under the control of the pol III promoter, wherein the pol III promoter and the foreign transcribable DNA are present in a gene transfer vector. The gene transfer vector may be a

-17-

retroviral vector. The gene transfer retroviral vector also may comprise a chimeric t-RNA introduced into the 3' long terminal repeat (LTR) region of the retroviral vector.

5

The retroviral vectors useful in the practice of this invention are, but not limited to, the murine retrovirus designated M-MuLV; the retrovirus designated N2; and the double copy vectors designated DCT5A, DCT5B and DCT5C. Additionally, in accordance with the practice of this invention, the foreign DNA molecule may be under the control of a t-RNA termination signal, and the termination signal having removed therein the 3' end processing DNA sequences.

10

The stably transformed eucaryotic cell may comprise two or more pol III promoters and two or more foreign transcribable DNAs, each under the control of one of the pol III promoters. The two or more pol III promoters may be contained within a single gene transfer vector, e.g., a retroviral vector.

15

20

This invention further provides a retroviral vector which comprises a chimeric t-RNA introduced into the 3' long terminal repeat (LTR) of the retroviral vector. The chimeric t-RNA may comprise a pol III promoter and a foreign transcribable DNA, the transcribable DNA being under the control of the pol III promoter. The retroviral vector also may comprise two or more pol III promoters and two or more transcribable DNAs, each under the control of one of the pol III promoters.

25

30

The foreign transcribable DNA may be virtually any DNA

35

-18-

capable of being transcribed into RNA, regardless of whether such RNA is subsequently translated into a polypeptide, for example, the transcribable DNA may encode an RNA capable of
5 acting as a false primer, i.e. a primer for initiation of reverse transcription; a ribozyme, i.e. an enzyme made of RNA, not protein; an antisense RNA; or an mRNA, including a polypeptide translatable therefrom; or a viral regulatory sequence such as the HIV regulatory sequence designated TAR.
10 The pol III promoter may be any promoter recognized by a pol III RNA polymerase. Examples of pol III promoters useful in the practice of this invention include, but are not limited to, t-RNA pol III promoter, such as human, plant or animal pol III promoter or mutant or derivative including chimeric
15 derivatives thereof, e.g. a human t-RNAi^{met} or the 3-5 derivative thereof.

In one embodiment the foreign transcribable DNA encodes antisense RNA which is complementary to a segment of an RNA
20 encoded by a pathogen, such as a retrovirus, e.g. the Human Immunodeficiency Virus (HIV) or a bacteria or a parasite. Alternatively, the transcribable DNA may encode an HIV regulatory sequence, e.g., the TAR sequence, or the REV recognition signal of HIV.

25 The foreign transcribable DNA may encode a molecule which inhibits the expression of a gene within the cell such as an endogenous gene or a foreign gene, e.g. a viral or retroviral gene present within the cell. For example, the
30 foreign transcribable DNA may encode a recognition sequence of a regulator of gene expression which acts through binding to a DNA, an RNA molecule, or a regulatory protein, within

35

-19-

the cell.

5 The gene transfer retroviral vector also may comprise a
chimeric t-RNA introduced into the 3' long terminal repeat
(LTR) region of the retroviral vector. The retroviral
vectors useful in the practice of this invention are, but
are not limited to, the murine retrovirus designated M-MuLV;
the retrovirus designated N2; and the double copy vectors
10 designated DCT5A, DCT5B and DCT5C. Additionally, in
accordance with the practice of this invention, the foreign
DNA molecule may be under the control of a t-RNA termination
signal, and the termination signal having removed therein
the 3' end processing DNA sequences.

15 This invention further provides stably transformed animal
cells; plant cells; mammalian cells, for example, mammalian
and human hematopoietic stem cells; and chicken cells, each
of which contain the pol III promoter and a foreign
20 transcribable DNA, wherein the transcribable DNA is under
the control of the pol III promoter, as described above.
These stably transformed cells may be contained within
transgenic animals, transgenic plants, transgenic mammals
and transgenic chickens, respectively.

25 The transgenic animal, plant, mammal or chicken described
above may contain a foreign transcribable DNA which encodes
for an RNA molecule which is complementary to a segment of
an RNA encoded by a pathogen. The pathogen may be, but is
30 not limited to, a retrovirus such as HIV, or a bacteria or
a parasite.

35

-20-

A vaccine useful for immunizing a patient against HIV infection is provided by this invention which comprises an effective amount of the retroviral vector described hereinabove wherein the foreign transcribable DNA encodes an HIV regulatory sequence, for example, the HIV regulatory sequence designated TAR and a suitable carrier. Suitable carriers useful in the practice of this invention include, but are not limited to any pharmaceutically acceptable carrier such as sterile saline, phosphate buffered saline or an emulsion.

This invention also provides a method of producing a foreign RNA which comprises culturing the stably transformed cells described above, under conditions permitting transcription of the transcribable DNA, thereby producing the foreign RNA. This method further provides recovering the foreign RNA molecule so produced. The foreign RNA molecule may comprise, but is not limited to antisense RNA, mRNA or unprocessed RNA.

This invention further provides a method of producing a polypeptide comprising culturing the stably transformed eucaryotic cells described above under conditions permitting transcription of the transcribable DNA into RNA and translation of the RNA into a polypeptide. In one embodiment of this invention, the polypeptide so produced is recovered.

This invention also provides a method of treating an Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) patient or preventing HIV infection in a patient which comprises

35

-21-

administering to the patient a retroviral vector as described hereinabove wherein the foreign transcribable DNA encodes for an antisense RNA molecule complementary to a segment encoded by HIV or a retroviral vector wherein the foreign transcribable DNA encodes an HIV regulatory sequence such as the sequence designated TAR. Suitable methods of administering the retroviral vector in pharmaceutical form are well known to those of ordinary skill in the art, and include but are not limited to administration of the retroviral vector in a pharmaceutically acceptable carrier. Suitable pharmaceutical carriers are described hereinabove. Suitable methods of administration include, but are not limited to administration orally, intravenously or parenterally. Administration of the vector must be in dose and in such a form such that the vector is transduced into the cell, so that the foreign DNA sequence is transcribed in an amount effective to inhibit HIV infection and/or replication.

A method of intracellularly immunizing a patient against HIV infection is also provided which comprises removing haematopoietic stem cells from the patient and infecting the removed stem cells with an effective amount of a retroviral vector described hereinabove wherein the foreign transcribable DNA encodes for an HIV regulatory sequence, such as the regulatory sequence designated TAR. The infected cells are then administered back into the patient, i.e. into the patient's bone marrow, thereby intracellularly immunizing the patient against HIV infection. For the purposes of this invention, intracellular immunization means prophylaxis as well as treatment of an infection.

35

Materials and Methods

The t-RNA transcriptional unit

5

Figure 1A shows the structure of a prototype mammalian t-RNA gene (ranging in size between 95-105 bp). In contrast to protein encoding genes (transcribed by pol III) the t-RNA promoter is encoded within the t-RNA gene itself, in two regions shown in Figure 1 as Box A and B. Termination of transcription is specified by a sequence present at the 3' end of the t-RNA gene (see Figure 1) which includes a run of 4 or more T nucleotides bracketed by 2 or more G or C nucleotides (on the sense strand of the DNA). Transcription of the t-RNA gene terminates in the second or third T. The RNA transcribed of the t-RNA gene, the primary transcript, is further processed resulting in the removal of sequences from the 5' and 3' end of the primary transcript, as shown in Figure 1 (9).

20

Human t-RNA^{met} and the 3-5 derivative

The human genome contains 10-12 t-RNA^{met} genes which are highly conserved among eucaryotes (32) (the human and mouse t-RNA^{met} genes are identical and do not cross-hybridize to other cellular t-RNAs (13)) and are responsible for 10-15% of total t-RNA synthesized in mammalian cells. As calculated above, expression of RNA from one t-RNA^{met} gene can be equal to or exceed the amount of total mRNA (pol II based) transcripts expressed in the cell. Figure 1B shows the structure of a t-RNA^{met} derivative, called 3-5 which was used in the studies described below. 3-5 contains a

35

-23-

deletion of 19 nucleotides from the 3' end of the t-RNA gene which has effectively eliminated the 3' processing signal, i.e. the removal of the sequences 3' to the mature t-RNA (1). The studies of Adeniyi-Jones (1) strongly suggests that insertion of foreign sequences between the end of the 3-5 t-RNA derivative and a termination signal will result in the synthesis of a chimeric RNA in which the bulk of the t-RNA transcript will remain fused to the foreign RNA sequence. This is illustrated in Figure 1C.

Other t-RNA derivatives, as well as other pol III, promoters (such as ribosomal 5S or adenovirus VAI promoters) can be used to affect the processing and/or cellular localization of the foreign RNA transcript. For example, by using the t-RNA^{met} derivative described by Adeniyi-Jones (1) which is called 3-2, the foreign RNA transcript will be removed and separated from the t-RNA moiety. By using t-RNA^{met} mutants as described by Tobian, et al. (35) it may be possible to direct the RNA transcripts into the nucleus or cytoplasm of the cell.

Construction of chimeric t-RNA genes

A chimeric t-RNA is a transcriptional unit formed by fusion of a foreign DNA sequence to the 3' end of a t-RNA gene or a portion of a t-RNA gene, which encodes the t-RNA promoter but lacks a transcriptional termination sequence, and a third DNA fragment fused to the 3' end of the foreign sequence which encodes a t-RNA transcription termination signal.

-24-

Using standard recombinant DNA techniques, three chimeric 3-5 t-RNA genes were generated by fusing 29 and 30 bp long DNA fragments to the 3' end of 3-5, followed by a short sequence to specify termination of transcription (Figure 1C). The sequences of the three DNA fragments are shown in Figure 2. The question addressed in these studies is whether stable gene transfer of the chimeric t-RNA genes into cultured cells will result in the synthesis of the corresponding RNA.

10

Cloning into DC retroviral vector

A retroviral vector was used to introduce the chimeric t-RNA genes into cultured mouse fibroblast cells. Figure 3 shows the structure of the retroviral vector used, the method of cloning and the essential features of this particular vector. The retroviral vector is a double copy (DC) vector called N2A and is derived from M-MuLV, a murine retrovirus (12). The chimeric t-RNA genes were cloned into the 3' LTR to generate vector constructs DCT5A, DCT5B and DCT5C. Using established procedures, the vector DNA was converted to corresponding virus and this virus was used to infect NIH 3T3 cells, an established mouse fibroblast cell line. In the infected cell it is expected that the chimeric t-RNA inserts will be duplicated and will appear in both 5' and 3' LTR as shown in Figure 3, a feature that may facilitate the expression of the hybrid t-RNA genes (14).

25

Analysis of cells infected with the chimeric t-RNA vectors

30

The three t-RNA based vectors described above and shown in Figure 2 and 3 were converted to corresponding virus using

35

-25-

established procedures (14, 27). Briefly, DCT5A and DCT5B vector DNAs were transfected into PA317, an amphotropic packaging cell line (27), G418 resistant colonies were pooled and supernatant was used as a source of virus to infect NIH 3T3 cells. Vector infected NIH 3T3 cells were selected in G418 and pooled colonies were analyzed. DCT5C virus was prepared by transient transfection of PA317 cells; infection of NIH 3T3 cells with supernatant collected 48 hours post transfection; G418 selection; and isolation of individual G418 resistant colonies were analyzed as described below. The structure of the vector DNA integrated in the NIH 3T3 cell chromosome was determined using known DNA blotting procedures and was shown to be intact (not shown). [As shown in Figure 3 and discussed in an article by Hantzopoulos, et al. (14), using DC vector, the chimeric t-RNA is duplicated in the infected cell.]

RNA blot analysis was performed to determine whether the cells harboring the chimeric t-RNA express the corresponding RNA in NIH 3T3 cells. Total cellular RNA was subjected to electrophoresis in 8% acrylamide-urea gels, blotted to nylon filters and hybridized with a ^{32}P -labelled t-RNA^{met} specific probe. The results of this analysis are shown in Figure 4A and 4B. The t-RNA probe detects two RNA species in uninfected NIH 3T3 cells in the size range of 70-90 nucleotides which represent the mature t-RNA^{met} and its unprocessed form. In cells infected with the t-RNA fusion genes an additional species is detected which corresponds in size to the chimeric RNA transcripts in which the t-RNA is fused to the foreign sequence.

-26-

Judging from the intensity of hybridization, the chimeric transcripts represent between 5% - 25% of total t-RNAi^{met} synthesized in the cell, suggesting that they are expressed very efficiently. [It is possible to estimate that if t-RNAi^{met} represent 10-15% of total t-RNA, and there are 10-12 t-RNA genes per genome and t-RNAs are 100 fold more abundant than the mRNA i.e., pol II transcripts, then the chimeric t-RNA present in the cell equals (within an order of magnitude) the total number of polyA+ transcripts. This would mean that the chimeric t-RNA carrying a foreign sequence is 100 fold to 10,000 fold more abundant than individual pol II transcripts. Expression of the chimeric t-RNA genes is not limited to the mouse fibroblast cell line NIH 3T3. Virus supernatant corresponding to DCT5A and DCT5B was used to infect HUT 78 cells, a human T-lymphoid cells line and individual clones isolated by G418 selection were analyzed for RNA expression. As shown in Figure 4C, the chimeric t-RNA genes are equally active in this human cell line.

Construction of a vector containing the HIV - TAR sequence

Construction of the N2A vector was described previously. The 3-5 tRNAi^{met} gene was then cloned into the Sna B1 site of the N2A vector such that transcription occurs parallel to LTR initiated transcription.

The pol III termination sequence "Ter" was cloned between the Sac II-MluI sites of the N2A polylinker. This oligonucleotide sequence contains a Bam HI restriction site. Previously, other Bam HI sites were removed from the vector

35

-27-

using techniques known to those of ordinary skill in the art.

5 The 63 base pair TAR oligonucleotide (see Figure 8) was then cloned between the Sac II - Bam HI sites from the "Ter" oligonucleotide upstream of the pol III termination sequence. This TAR sequence is derived from the ARV-Z strain of HIV-I (31).

10

Inhibition of M-MuLV replication in cells harboring
chimeric t-RNA antisense templates

15 DCT5C contains a chimeric t-RNA gene fused to a 29 nucleotide long sequence which is complementary to a portion of M-MuLV. M-MuLV is a prototype murine retrovirus which replicates efficiently in NIH 3T3 cells expressing high levels of viral RNA in the cells reaching 1-5% of total polyA+ RNA (7, 36). The ability of DCT5C to inhibit M-MuLV
20 replication represents a stringent test as to the potential of this new approach to inhibit the expression of genes and protect cells from the replication of viruses.

25 In the experiment shown in Figure 5, three NIH 3T3 derived clones harboring the DCT5C vector and two clones containing the parent vector, DCT5 (which does not contain the antisense sequence) were infected with M-MuLV at a multiplicity of infection (M.O.I.) of about 2. The ability of the cells to support the replication of M-MuLV was
30 determined by measuring the secretion of virus from the cells (determined by the appearance of reverse transcriptase (R.T.) activity in the supernatant of infected cells). As

35

-28-

shown in Figure 5, in cells harboring the antisense templates M-MuLV replication was inhibited 70%-95%.

5 In a second experiment to test the ability of the antisense vectors to inhibit the spread of M-MuLV in culture, the above described cell lines were infected at a M.O.I. of 0.002 and the spread of M-MuLV was monitored by FACS analysis, to determine the fraction of cells infected with
10 M-MuLV. As shown in Figure 6, presence of M-MuLV specific antisense templates in cells leads to significant inhibition in the ability of M-MuLV to spread in the culture.

The experiments described in this section shows that: (a)
15 chimeric t-RNA based transcriptional units can be stably introduced into eucaryotic cells resulting in high levels of corresponding RNA expression; and (b) a M-MuLV specific antisense template fused to the t-RNA promoter results in the efficient inhibition of M-MuLV replication in the
20 corresponding cells. Since M-MuLV is a very efficient transcriptional unit, the experiments shown in Figures 5 and 6 testify to the potency of a pol III based transcriptional unit.

25 Inhibition of HIV replication in cells harboring chimeric t-RNA antisense templates

DCT5A and DCT5B contain a chimeric t-RNA gene fused to 30
base-pair long nucleotide sequences, which upon
30 transcription yield RNA species which are complementary to portions of the HIV genome (see Figures 2 and 3). The ability of the two vectors, DCT5A and DCT5B, to inhibit the

35

-29-

replication of HIV in susceptible human lymphoid cells was tested and the results are shown in Figure 7.

5 Virus corresponding to DCT5A and DCT5B was used to infect HUT 78 cells (a human cutaneous T cell lymphoma derived cell line) and individually infected cells were cloned in soft agar in the presence of G418. Independently derived clones were tested for their ability to support the replication of
10 HIV. As a control, HUT 78 cells were infected with a virus derived from a similar vector in which an unrelated sequence (the human adenosine deaminase minigene) was introduced into the 3'LTR of the N2 derived vector. The ability of HIV to replicate in HUT 78 cells containing the antisense vectors
15 and the control vector was determined by measuring the appearance of R.T. activity in the medium. Figure 7 shows the result of such an experiment. As shown in Figure 7, replication of HIV cell lines harboring the DCT5A vector (A1-A3) is inhibited between the three cell lines and this
20 correlates to the amount of antisense RNA present in the cell as can be seen in Figure 4C. Replication of HIV in the three cell lines harboring the vector DCT5B is virtually shut down (Figures 7, B1, B2 and B4). In one cell line, B3, HIV replication was not affected. The reason for that is
25 not known. The ability of HIV to replicate in the HUT 78 derived cell lines was also measured using in site immunofluorescence (IFA) and the results of this experiment were consistent with R.T. analysis (not shown). For example, after 14 days in culture, 40-80% of the cells in
30 the three control cell lines scored positive while no positive cells were detected in cell lines A1, B1, B2 and B4 (in a field containing about 1000 cells) and only few

-30-

positive cells were present in A2 and A3 cells, while B3 cells were indistinguishable from the control.

5 In summary, the experiments described in this section show that the stable transfer into cells of DNA constructs which consist of chimeric t-RNAs fused to HIV specific antisense templates, inhibit HIV replication. In other words, the antisense vector containing cells are protected from HIV
10 replication, and consequently from its deleterious effects. The prospects of applying this methodology to human AIDS patients in which the antisense vectors are introduced into the patient to protect the patient from HIV replication and further progression of AIDS, represents an exciting and
15 novel strategy to combat this dreadful disease (3).

Inhibition of HIV R.T. production in "TAR" decoy cells

20 The expression of the HIV genes is regulated by the viral gene product designated tat. Binding of the tat gene product to a specific sequence on the viral RNA, called TAR, is required for HIV gene expression and generation of virus. The tat recognition sequence was mapped to the 5' end of the viral RNA to encompass 60 nucleotides or less of RNA (31).

25

A 60 base pair oligonucleotide encompassing the TAR sequence was chemically synthesized. (see Figure 8). A retroviral vector as shown in Figure 1-3 was constructed in which the TAR containing oligonucleotide is fused to a t-RNA gene and
30 inserted into the 3' LTR of the M-MuLV based N2 vector. A detailed description of the construction of this vector is described hereinabove.

35

-31-

In the experiment shown in Figure 9, clonal isolates of CEMSS cells, an HIV-1 susceptible human T-cell line harboring TAR - containing vectors or a control vector were infected with HIV-1 at a multiplicity of infection (M.O.I.) of about 2. The ability of the vector to efficiently synthesize TAR and thereby inhibit the replication of HIV was determined by measuring the secretion of virus from the cells (determined by the appearance of reverse transcriptase (R.T.) activity in the supernatant of infected cells). As shown in Figure 9, two clonal isolates of CEMSS cells that were characterized to harbor the control vector did support HIV replication. This is documented by the appearance of reverse transcriptase (R.T.) activity in the media.

On the other hand, in two cloned CEMSS isolates characterized to harbor and express the TAR sequences, HIV replication was significantly inhibited, i.e., in a range from 90-95% inhibition.

Figure 10 shows the results of a separate experiment which was conducted as described above, except that R.T. activity was measured at intervals up to 24 days post infection. As can be seen in Figure 10, not only is HIV replication significantly inhibited as compared to the control at 14 days post infection, but the duration of the inhibitory effect was established up to 24 days post infection.

The experiments shown in Figures 9 and 10 clearly demonstrate that the synthesis of a chimeric TAR containing transcript acts as "decoy" to bind the tat gene product synthesized in the HIV infected cells, thereby preventing

-32-

the binding of tat to its physiological target, the TAR sequence in the HIV genome. This leads to the lack of activation of HIV gene expression and inhibition of HIV replication in cultured CEMSS cells.

Potential applications of pol III based transcriptional units mediated via stable gene transfer

10 The ability to synthesize high levels of specific RNA transcripts in eucaryotic cells in a genetically stable manner offers wide range of useful applications and a few examples are listed below.

15 Protection of human patients from infectious pathogens

Antisense RNA inhibition protocols mediated via stable gene transfer can be used to render cells resistant to the replication of pathogens. The strategy involves the introduction, via an antisense vector, of antisense templates, i.e., a DNA molecule encoding a transcriptional unit, which upon introduction into a cell is capable of synthesizing an antisense RNA molecule, into the uninfected cell to express constitutively antisense RNA specific to a given pathogen. When challenged with the pathogen, expression of its genes or any other aspect of its replication will be inhibited and consequently pathogen replication in the cell and spread to other cells will be limited. The feasibility of such a strategy to inhibit the replication of HTLV-I, a human retrovirus, in human T-lymphoid cells was recently demonstrated (30) and the experiments shown in Figures 5 and 6 demonstrated that t-RNA

-33-

based antisense templates are effective in protecting cells from M-MuLV replication. The application of this technology to the treatment of AIDS and other pathogen caused diseases can be considered (3). It may be also possible to use antisense RNA technology to inhibit other genes which are deleterious to human patients such as oncogenies.

Generation of animals and plant breeds (transgenic) which are resistant to pathogens

Generation of transgenic animals and plants which carry effective antisense templates can be used to generate new animal and plant breeds which are resistant to a host of pathogens. Antisense RNA based strategies have been used with limited success to generate transgenic plants, in many cases achieving a level of inhibition insufficient to provide effective protection from pathogens (22).

The experiments described in the previous section have shown that pol III based promoters can be used to express in a genetically stable manner, high levels of desired RNA transcripts in the eucaryotic cell, and may be useful in the generation of animal and plant breeds carrying effective antisense templates. The same technology can be also used in a general way to inactivate specific genes in transgenic animal or plants. This can be used as a means to regulate various functions and properties of the transgenic breeds (21) or to introduce specific mutations to generate model systems for human genetic disorders (19), or to investigate consequences of gene dysfunction.

-34-

Additional strategies of gene inhibition which require efficient RNA synthesis

5 The concept of gene inhibition via stable gene transfer was recently discussed in a commentary in Nature and termed "intracellular immunization" because it can be used to protect a cell from the replication of infectious pathogens (3). There are potentially a large number of mechanisms
10 that can be employed for this purpose (i.e., gene inhibition) antisense RNA inhibition being one such approach. Another strategy, involving the design of a defective regulatory protein which functions as a competitive inhibitor during gene expression and replication
15 of Herpes Simplex Virus (HSV), also was described (8).

One particular application which involves the use of a regulatory protein which functions as a competitive
20 inhibitor to bind to an HIV protein necessary for activating transcription of HIV genes, involves the vector construct containing TAR sequences.

In this "intracellular immunization" therapy, bone marrow
25 cells would be taken from a patient, including all the important haematopoietic stem cells. The stem cells will then be infected with the TAR-containing retroviral vector, in an amount which is effective to produce an amount of the TAR oligonucleotide decoy, such that the HIV tat protein
30 binds to the TAR decoys and is competed away from binding to the HIV genome, thereby inhibiting the activation of transcription.

35

-35-

These modified stem cells will then be injected into the patient and back to the bone marrow by methods well known to those of ordinary skill in the art. Radiation therapy or the administration of a cytotoxic drug to the patient may be used to facilitate the growth of the implanted cells. This "intracellular immunization" therapy would be useful not only to treat HIV positive patients, but would also be useful to prevent HIV infection.

10

This section describes three strategies for genes inhibition which differ from the antisense inhibition strategy which involves the formation of stable RNA:RNA or RNA:DNA hybrids as described by Weintraub, et al. (37), Coleman et al. (5), and van der Krol, et al. (22). The common denominator of the three strategies is their dependence on the ability to express high levels of specific RNAs in the cell, which is the subject of this invention.

15

20 False priming

This approach is useful for the inhibition of replication of retroviruses such as HIV, the etiological agent of AIDS. Upon penetration of a virus into the cell, one of the earliest events in its replication involves the reverse transcription of the viral RNA genome into a double stranded DNA form. This reaction is carried out by a virus specific enzyme called reverse transcriptase (R.T.). Initiation of reverse transcription occurs via a priming reaction in which a cellular t-RNA bound to a specific region of the viral genome serves as a primer. Elongation involves not only synthesis of the DNA strand but it also involves the

25

30

35

-36-

degradation of the RNA template by an RNAase H activity which is part of or physically associated with reverse transcriptase (36).

5

The strategy of false priming involves the synthesis of specific primers which will initiate reverse transcription and virion RNA degradation at various locations throughout the viral genome, and hence lead to abrogation of the replication cycle.

10

The advantage of false priming as compared to antisense RNA inhibition which requires the formation of thermodynamically stable RNA:RNA hybrids is that it: (a) does not require the formation of stable hybrids; and (b) results in the irreversible inhibition (via degradation) of the target RNA.

15

Gene inhibition via false priming requires the synthesis of RNA which is complementary to the target RNA throughout its 3' end (to which the DNA strand is added). Consequently, pol II based transcriptional units cannot be used to inhibit genes via false priming because pol II transcripts contains a stretch of poly A at their 3' end. On the other hand, pol III based transcriptional units are uniquely suited to inhibit genes via false priming because they can be used to generate the required RNA primers. The unique mechanism of RNA termination of pol III transcripts enables the design of specific transcripts which are complementary throughout the 3' end to a given RNA template and therefore can act as primers for reverse transcription. Briefly, pol III terminates transcription in a run of Ts, four or more, which is bracketed by a region of G and/or C nucleotides (9). The

20

25

30

35

-37-

pol III transcript terminates after the second or third T. Consequently, a primer can be generated to correspond to a specific region of the retroviral genome which contains at the 3' end the sequence (G or C)₂AAA. The primer sequence which can be synthesized chemically, is fused to a pol III promoter at the 5' end. At the 3' end, the primer will contain an additional sequence of two or three T nucleotides, followed by several G and/or C nucleotides to regenerate a pol III transcription termination signal.

Gene inactivation via ribozymes

Haseloff and Gerlach (15) have recently shown that it is possible to cleave RNA molecules at specific sequences using artificial ribozymes. This experimental strategy can be used to inactivate specific genes by designing a transcriptional unit encoding such ribozymes.

20 Functional inactivation of gene regulators

Another approach which requires the efficient synthesis of specific RNA species in the cell, may be used to functionally inactivate gene activators or inhibitors and consequently inhibit or activate gene expression. For example, the HIV encoded rev gene product is a gene activator and regulates the expression of the HIV genome in the infected cell via direct binding to a specific sequence on the HIV genome called RRE (12, 24). By engineering a cell which expresses high levels of an RNA transcript containing the RRE sequence, the rev gene will bind to this RNA and therefor will not be available for binding to the

-38-

HIV RRE sequence. Consequently, the HIV genes will not be expressed, thereby inhibiting HIV production and spread.

5 In a similar fashion it may be possible to use t-RNA promoter based RNA transcriptional units to inactivate the function of gene regulators which mediate their function by binding to specific DNA sequences. This can be achieved by designing a DNA template that generates an RNA transcript
10 containing a palindrome which will fold into a double stranded structure containing the sequence corresponding to the recognition sequence of the DNA binding gene regulator. The presence of high levels of double stranded RNA forms of the recognition sequence, compared to only two copies of the
15 actual DNA sequence in the cell, may compete effectively for the DNA binding protein.

Large scale production of proteins in eucaryotic cells

20 The advent of genetic engineering opened the door to the large scale production of specific proteins which in turn spawned a whole new biotechnology industry. Although bacteria are the host of choice in this process, in many cases it is necessary to use mammalian cell based production
25 systems to obtain biologically active products. Mammalian cell based production systems are more complex, expensive and far less efficient in protein synthesis in comparison to bacterial based systems. Presently, the main strategy used to improve the production of genetically engineered proteins
30 in mammalian cells involves the co-amplification of the corresponding gene which is fused to an amplifiable gene such as DHFR. The major limitation of this approach is that

35

-39-

the amplification process requires about 8-12 months and is fraught with uncertainties, mainly due to the frequent loss of the desired gene during the amplification process.

5

The experiments described hereinabove offer an alternative approach for the large scale production of proteins in mammalian cells because it generates 100-10,000 fold higher levels of RNA transcripts in the cell as compared to conventionally employed pol II based transcriptional unit systems. The pol III based system can potentially produce mRNA for protein synthesis without the lengthy amplification process.

15

20

25

30

35

-40-

References

- 5 1. Adeniyi-Jones, S., Romeo, P.H. and Zasloff, M. (1984).
Generation of long read-through transcripts in vivo and
in vitro by deletion of 3' termination and processing
sequences in the human tRNA^{met} gene. Nucl. Acid Res.
12: 1101-1115.
- 10 2. Armentano, D., Yu, S-F, Kantoff, P.W., von Ruden, T.,
Anderson, W.F., and Gilboa, E. (1987). Effect of
internal viral sequences on the utility of retroviral
vectors. J. of Virol. 61: 1647-1650.
- 15 3. Baltimore, D., (1988). Intracellular immunization.
Nature. 335: 395-396.
- 20 4. Chang, L-J., Stoltzfus, C.M. (1985). Gene expression
from both intronless and intron-containing Rous sarcoma
virus clones is specifically inhibited by antisense
RNA. Mol. Cell. Biol. 5: 2341-2348.
- 25 5. Coleman, J., Hirashima, A., Inokuchi, Y., Green, P.J.
and Inouye, M. (1985). A novel immune system against
bacteriophage infection using complementary RNA (mic
RN). Nature. 315: 601-603.
- 30 6. De la Pena, P. and Zasloff, M., (1987). Enhancement of
mRNA nuclear transport by promoter elements. Cell. 50:
613-619.
- 35 7. Fan, H. and Baltimore, D. (1973). RNA metabolism of

-41-

murine leukemia virus: Detection of virus-specific RNA sequences in infected cells and identification of virus-specific messenger RNA. J. Mol. Bio. 80: 93-117.

5

8. Friedman, A.D., Triezenberg, S.J. and McKnight, S.L. (1988). Expression of a truncated viral trans-activator selectively impedes lytic infection by its cognate virus. Nature. 335: 452-454.

10

9. Geiduschek, E.P. (1988). Transcription by RNA polymerase III. Ann. Rev. Biochem. 57: 873-914.

15

10. Goff, S., Traktman, P. and Baltimore, D., (1981). Isolation and properties of Moloney murine leukemia virus mutants: Use of rapid assay for release of virion reverse transcriptase. J. of Virol. 38: 239-248.

20

11. Green, P.J., Pines, O. and Inouye, M. (1986). The role of antisense RNA in gene regulation. Ann. Rev. Biochem. 55: 569-597.

25

12. Hadzopoulou-Cladaras, M., Felber, B.K., Cladaras, C., Anthanassopoulos, A., Tse, A. and Pavlakis, G.N. (1989). The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. J. of Virol. 63: 1265-1274.

30

13. Han, J.H., Rooney, R.J. and Harding, J.D. (1984). Structure and evolution of mammalian tRNA genes:

35

-42-

sequence of a mouse tRNA^{met} gene, the 5'-flanking region of which is homologous to a human gene. *Gene*. 28: 249-255.

5

14. Hantzopoulos, P.A., Sullenger, B.A., Unger, G. and Gilboa, E. (1989). Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the transcriptional unit to a retroviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. (In Press).

10

15. Haseloff, J. and Gerlach, W.L. (1988). Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 334: 585-591.

15

16. Izant, J.G. and Weintraub H. (1984). Inhibition of thymidine kinase gene expression by antisense RNA: A molecular approach to genetic analyses. *Cell* 36: 1007-1015.

20

17. Izant, J.G. and H. Weintraub (1985). Constitutive and conditional suppression of exogenous and endogenous genes by antisense RNA. *Science*. 229: 345-352.

25

18. Jennings, P.A. and Molloy, P.L., (1987). Inhibition of SV40 replicon function by engineered antisense RNA transcribed by RNA polymerase III. *The EMBO Journal* 6: 3043-3047.

30

19. Katsuki, M., Sato, M., Kimura, M., Yokoyama, M., Kobayashi, K, and Nomura (1988). Conversion of normal behavior to shiverer by myelin basic protein antisense

35

-43-

cDNA in transgenic mice. Science 241: 593-595.

- 5 20. Kim, S.K., Wold, B.J. (1985). Stable reduction of thymidine kinase activity in cells expressing high levels of antisense RNA. Cell 42: 129-138.
- 10 21. van der Krol, A.R., Lenting, P.E., Veenstra, J., van der Meer, I.M., Koes, R.E., Gerats, A.G.M., Mol, J.N.M. and Stuitje, A.R. (1988). An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. Nature. 333: 866-869.
- 15 22. van der Krol, A.R., Mol, J.N.M., and Stuitje, A.R., (1988). Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. BioTechniques. 6: 958-976.
- 20 23. Lewis, D.E. Manley, J.L. (1986). Polyadenylation of an mRNA precursor occurs independently of transcription by RNA polymerase II in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8555-8559.
- 25 24. Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.-Y., Maizel, J.V. and Cullen, B.R. (1989). The HIV-1 rev transactivator acts through a structures target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. Nature 338: 254-257.
- 30 25. McGarry, T.J. and Lindquist, S. (1986). Inhibition of heat shock protein synthesis by heat-inducible antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 399-403.

-44-

- 5 26. Melton, D. (1985). Injected antisense RNAs specifically block messenger RNA translation in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 144-148.
- 10 27. Miller, A.D., and Buttimore, C., (1986). Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. Mol. Cell. Biol. 6: 2895-2902.
- 15 28. Paterson, B.M., Roberts, B.E. and Kuff, E.L. (1977). Structural gene identification and mapping by DNA mRNA hybrid-arrest cell-free translation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4370-4374.
- 20 29. Pestka, S., Daugherty, B.L., Jung, V., Hotta, K. and Pestka, R.K. (1984). Anti-mRNA: Specific inhibition of translation of single RNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7525-7528.
- 25 30. von Ruden, T. and Gilboa, E., (1989). Inhibition of human t-cell leukemia virus type I replication in primary human T cells that express antisense RNA. J. of Virol. 63: 677-682.
- 30 31. Sanchez-Prescador, R., Power, M.D., Barr, P.J., Steimer, K.S., Stempien, M.M., Brown-Shimer, S.L., Gee, W.W., Renard, A., Randolph, A., Levy, J.A., Dina, D., and Luciw, P.A. (1985). Nucleotide sequence and expression of an AIDS-Associated Retrovirus (ARV-2). Sci. 277: 484-492.
- 35

-45-

- 5 32. Santos, T. and Zasloff, M. (1981). Comparative analysis of human chromosomal segments bearing nonallelic dispersed tRNA^{met} genes. *Cell* 23: 699-709.
33. Shinnick, T.M., Lerner, R.A., and Sutcliffe, J.G. (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukemia virus. *Nature* 293: 543-548.
- 10 34. Sisodia, S.S., Sollner-webb, B., Cleveland, D.W. (1987). Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation. *Mol. Cell Biol.* 7: 3602-3612.
- 15 35. Tobian, J.A., Drinkard, L., and Zasloff, M. (1985). tRNA nuclear transport: Defining the critical regions of human tRNA^{met} by point mutagenesis. *Cell*. 43: 415-422.
- 20 36. Varmus, H. and Swanstrom, L., (1982). Replication of retroviruses. (R. Weiss, N. Teish, H. Varmus and J. Coffin, eds.) *RNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York. 369-512.
- 25 37. Weintraub, H., Izant, J.G., Harland, R.M., (1985). Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis. *Trends in Genetics.* 2: 22-25.
- 30 38. Zamecnik, P.C. and Stephenson, M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide.
- 35

-46-

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 280-284.

- 5 39. Molecular and Cell Biology (1986) J. Darnell, H.
Lodish, D. Baltimore, eds., Scientific American Books,
New York, New York, p. 137, Table 5-3.

10

15

20

25

30

35

-47-

What is claimed is:

- 5 1. A stably transformed eucaryotic cell comprising a pol
III promoter and a foreign transcribable DNA, the
foreign transcribable DNA being under the control of
the pol III promoter.
- 10 2. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the foreign transcribable DNA encodes a false
primer.
- 15 3. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the foreign transcribable DNA encodes a
ribozyme.
- 20 4. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the foreign transcribable DNA encodes an
antisense RNA.
- 25 5. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the foreign transcribable DNA encodes an mRNA.
- 30 6. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the foreign transcribable DNA encodes a
polypeptide.
7. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the pol III promoter comprises a t-RNA or a
mutant or derivative thereof.
8. A stably transformed eucaryotic cell of claim 7,

35

-48-

wherein the pol III promoter comprises a human t-RNA or a mutant or derivative thereof.

- 5 9. A stably transformed eucaryotic cell of claim 8,
 wherein the pol III promoter comprises a t-RNAi^{met} or a
 mutant or derivative thereof.
- 10 10. A stably transformed eucaryotic cell of claim 8,
 wherein the pol III promoter comprises a plant pol III
 promoter or a mutant or derivative thereof.
- 15 11. A stably transformed eucaryotic cell of claim 8,
 wherein the pol III promoter comprises an animal pol
 III promoter or a mutant or derivative thereof.
- 20 12. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
 wherein the foreign transcribable DNA encodes a
 molecule which inhibits expression of a gene within the
 cell.
- 25 13. A stably transformed eucaryotic cell of claim 4,
 wherein the antisense RNA comprises RNA which is
 complementary of a segment to an RNA encoded by a
 pathogen.
- 30 14. A stably transformed eucaryotic cell of claim 13,
 wherein the RNA encoded by pathogen comprises mRNA.
- 35 15. A stably transformed eucaryotic cell of claim 13,
 wherein the pathogen comprises the Human
 Immunodeficiency Virus (HIV).

-49-

- 5 16. A stably transformed eucaryotic cell of claim 15,
wherein the foreign transcribable DNA encodes the
recognition signal of the HIV gene product designated
REV.
- 10 17. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the foreign transcribable DNA encodes an HIV
regulatory sequence.
- 15 18. A stably transformed eucaryotic cell of claim 17,
wherein the HIV regulatory sequence is the HIV sequence
designated TAR.
- 20 19. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the foreign transcribable DNA encodes a
recognition sequence of a regulator of gene expression
which acts through binding to a DNA molecule or an RNA
molecule.
- 25 20. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the eucaryotic cell comprises an animal cell.
- 30 21. A stably transformed eucaryotic cell of claim 20,
wherein the animal cell comprises a mammalian cell.
22. A stably transformed eucaryotic cell of claim 21,
wherein the mammalian cell comprises a human cell.
23. A stably transformed eucaryotic cell of claim 20,
wherein the animal cell comprises a chicken cell.

35

-50-

- 5 24. A stably transformed mammalian cell of claim 21,
wherein the mammalian cell comprises a haematopoietic
stem cell.
25. A stably transformed human cell of claim 22, wherein
the human cell comprises a haematopoietic stem cell.
- 10 26. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the eucaryotic cell comprises a plant cell.
- 15 27. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1,
wherein the pol III promoter and the foreign
transcribable DNA are present in a gene transfer
vector.
- 20 28. A stably transformed eucaryotic cell of claim 27,
wherein the gene transfer vector is a retroviral
vector.
- 25 29. A stably transformed eucaryotic cell of claim 28,
wherein the retroviral vector comprises a chimeric t-
RNA introduced into the 3' long terminal repeat (LTR)
region of the retroviral vector.
- 30 30. A stably transformed eucaryotic cell of claim 28,
wherein the retroviral vector comprises the murine
retrovirus designated M-MuLV.
- 35 31. A stably transformed eucaryotic cell of claim 28,
wherein the retroviral vector comprises the retrovirus
designated N2.

-51-

- 5 32. A stably transformed eucaryotic cell of claim 28, wherein the retroviral vector comprises the retrovirus designated DCT5A.
33. A stably transformed eucaryotic cell of claim 28, wherein the retroviral vector comprises the retrovirus designated DCT5B.
- 10 34. A stably transformed eucaryotic cell of claim 28, wherein the retroviral vector comprises the retrovirus designated DCT5C.
- 15 35. A stably transformed eucaryotic cell of claim 29, wherein the chimeric t-RNA comprises a foreign DNA molecule under the control of a t-RNA termination signal, and the termination signal having removed therefrom the 3' end processing DNA sequences.
- 20 36. A stably transformed eucaryotic cell of claim 1 comprising two or more pol III promoters and two or more foreign transcribable DNAs, and each of the foreign transcribable DNAs being under the control of one of the pol III promoters.
- 25 37. A retroviral vector which comprises a chimeric t-RNA introduced into the 3' long terminal repeat (LTR) of the retroviral vector.
- 30 38. A retroviral vector of claim 36, wherein the chimeric t-RNA comprises a pol III promoter and a foreign transcribable DNA, the transcribable DNA being under

35

-52-

the control of the pol III promoter.

- 5 39. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes a false primer.
40. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes a ribozyme.
- 10 41. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes antisense RNA molecule.
42. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes an mRNA molecule.
- 15 43. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes a polypeptide.
- 20 44. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes a viral regulatory sequence.
45. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes an HIV regulatory sequence.
- 25 46. A retroviral vector of claim 44, wherein the HIV regulatory sequence is the HIV regulatory sequence designated TAR.
- 30 47. A retroviral vector of claim 38, wherein the pol III promoter comprises a t-RNA or a mutant or derivative thereof.

35

-53-

- 5 48. A retroviral vector of claim 38, wherein the pol III promoter comprises a human t-RNA or a mutant or derivative thereof.
49. A retroviral vector of claim 38, wherein the pol III promoter comprises t-RNA^{met} or a mutant or derivative thereof.
- 10 50. A retroviral vector of claim 38, wherein the pol III promoter comprises a plant pol III promoter or a mutant or derivative thereof.
- 15 51. A retroviral vector of claim 38, wherein the pol III promoter comprises an animal pol III promoter or a mutant or derivative thereof.
- 20 52. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes a molecule which inhibits expression of a gene within the cell.
- 25 53. A retroviral vector of claim 41, wherein the antisense RNA molecule comprises an RNA molecule which is complementary of a segment of an RNA encoded by a pathogen.
54. A retroviral vector of claim 53, wherein the RNA encoded by the pathogen comprises mRNA.
- 30 55. A retroviral vector of claim 53, wherein the pathogen comprises the Human Immunodeficiency Virus (HIV).
- 35

-54-

56. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes the recognition signal of the HIV molecule designated REV.
57. A retroviral vector of claim 38, wherein the foreign transcribable DNA encodes a recognition sequence of a regulator of gene expression which acts through binding to a DNA molecule or an RNA molecule.
58. A retroviral vector of claim 38, wherein the retroviral vector comprises the murine retrovirus designated M-MuLV.
59. A retroviral vector of claim 38, wherein the retroviral vector comprises the retrovirus designated N2.
60. A retroviral vector of claim 38, wherein the retroviral vector comprises the retrovirus designated DCT5A.
61. A retroviral vector of claim 38, wherein the retroviral vector comprises the retrovirus designated DCT5B.
62. A retroviral vector of claim 38, wherein the retroviral vector comprises the retrovirus designated DCT5C.
63. A retroviral vector of claim 37, wherein the retroviral vector comprises two or more pol III promoters and two or more foreign transcribable DNAs, and each of the foreign transcribable DNAs being under the control of one of the pol III promoters.

35

-55-

64. A transgenic animal comprising a stably transformed animal cell of claim 20.
- 5 65. A transgenic mammal comprising a stably transformed mammalian cell of claim 21.
66. A transgenic chicken comprising a stably transformed chicken cell of claim 23.
- 10 67. A transgenic mammal comprising a stably transformed mammalian cell of claim 24.
- 15 68. A transgenic plant comprising a stably transformed plant cell of claim 26.
- 20 69. A transgenic animal of claim 65, wherein the foreign transcribable DNA encodes an RNA molecule which is complementary to a segment of an RNA encoded by a pathogen.
- 25 70. A transgenic mammal of claim 64, wherein the foreign transcribable DNA encodes an RNA molecule which is complementary to a segment of an RNA encoded by a pathogen.
- 30 71. A transgenic plant of claim 68, wherein the foreign transcribable DNA encodes an RNA molecule which is complementary to a segment of an RNA encoded by a pathogen.

-56-

72. A transgenic animal of claim 69, wherein the pathogen comprises HIV.
- 5 73. A transgenic animal of claim 64, wherein the foreign transcribable DNA encodes an HIV regulatory sequence.
74. A transgenic animal of claim 73, wherein the HIV regulatory sequence comprises the HIV regulatory sequence designated TAR.
- 10 75. A transgenic animal of claim 73, wherein the transgenic animal is a mammal.
- 15 76. A gene transfer vector which comprises the retroviral vector of claim 37, wherein the retroviral vector has two or more pol III promoters and two or more foreign transcribable DNAs, and each of the foreign transcribable DNAs being under the control of one of
- 20 the pol III promoters.
77. A vaccine useful for immunizing a patient against HIV infection which comprises an effective immunizing amount of the retroviral vector of claim 46 and a
- 25 suitable carrier.
78. A method of producing a foreign RNA which comprises culturing the stably transformed eucaryotic cell of claim 1, under conditions permitting transcription of the transcribable DNA and thereby producing the foreign RNA.
- 30

35

-57-

79. A method of claim 78, further comprising recovering the foreign RNA molecule so produced.
- 5 80. A method of claim 78, wherein the RNA molecule comprises antisense RNA.
81. A method of claim 78, wherein the RNA molecule comprises an mRNA molecule.
- 10 82. A method of producing a polypeptide comprising culturing the stably transformed eucaryotic cell of claim 1 under conditions permitting transcription of the transcribable DNA into RNA and translation of the RNA into the polypeptide and thereby producing a polypeptide.
- 15 83. A method of claim 82, further comprising recovering the polypeptide so produced.
- 20 84. A method of treating an Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) patient which comprises administering to the patient the retroviral vector of claim 46.
- 25 85. A method of treating an Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) patient which comprises administering to the patient the retroviral vector of claim 46.
- 30 86. A method of immunizing a patient against HIV infection which comprises administering to the patient an effective immunizing amount of the vaccine of claim 77.
- 35

-58-

87. A method of intracellularly immunizing a patient against HIV infection which comprises:

- 5 a) removing haematopoietic stem cells from the patient;
- b) infecting the removed haematopoietic stem cells with effective amount of the retroviral vector of
10 claim 46; and
- c) injecting back into the patient the retroviral infected haematopoietic cells to intracellularly
15 immunize a patient against HIV infection.

20

25

30

35

1/12

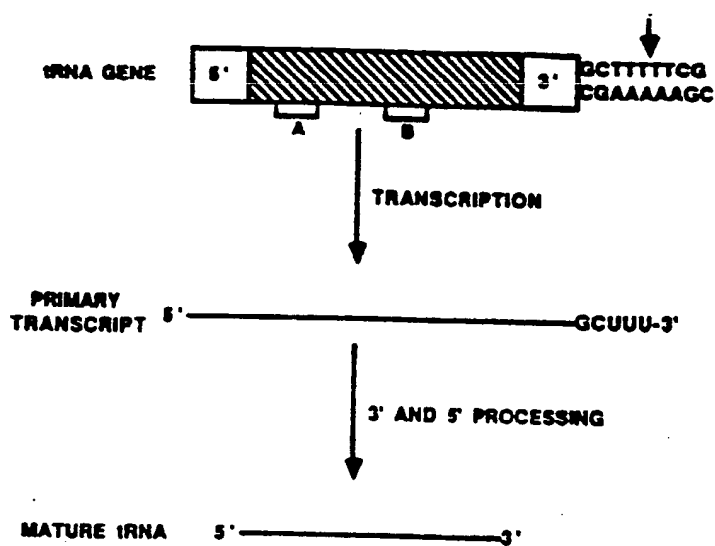


FIGURE 1A

2 / 12

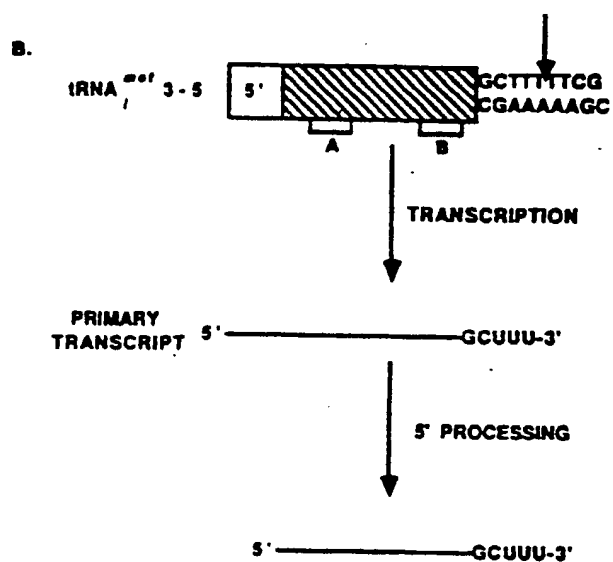


FIGURE 1B

3 / 12

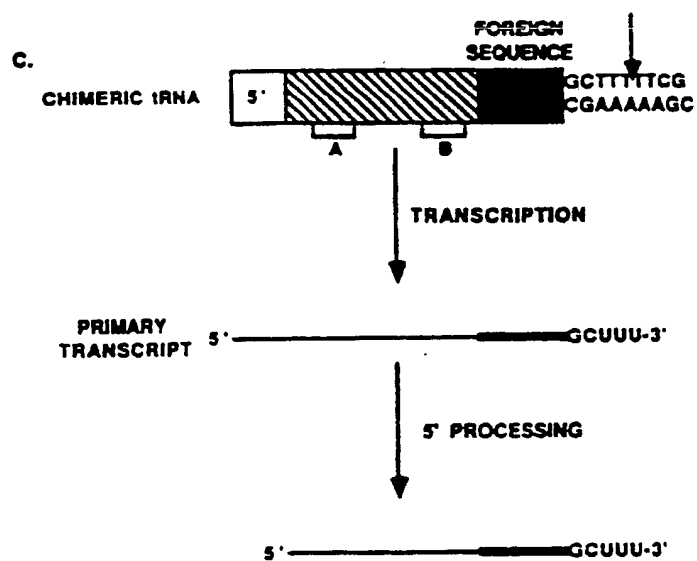


FIGURE 1C

A.

SACII

TERMINATION MLU I

5'-GGACACTACTTGAAGCACTCAAGGCAAGCTTTTGCTA-3'
3'-CGCCTGTGATGAACTTCGTGAGTTCGTTTCGAAAACGATGCGC-5'

B.

SACII

TERMINATION MLU I

5'-GGCTTCCTGCCATAGGAGATGCCTAAGCCTTTTGGCA-3'
3'-CGCCGAAGGACGGTATCCTCTACGGATTCGGAAAACCGTGCGC-5'

C.

SACII

TERMINATION MLU I

5'-GGCCAAATTGGTGGGGCTTCTGCCCGCGTTTTTGGGA-3'
3'-CGCCGGTTTAACCACCCCGAAGACGGGCGCAAAAACCTGCGC-5'

FIGURE 2

5 / 12

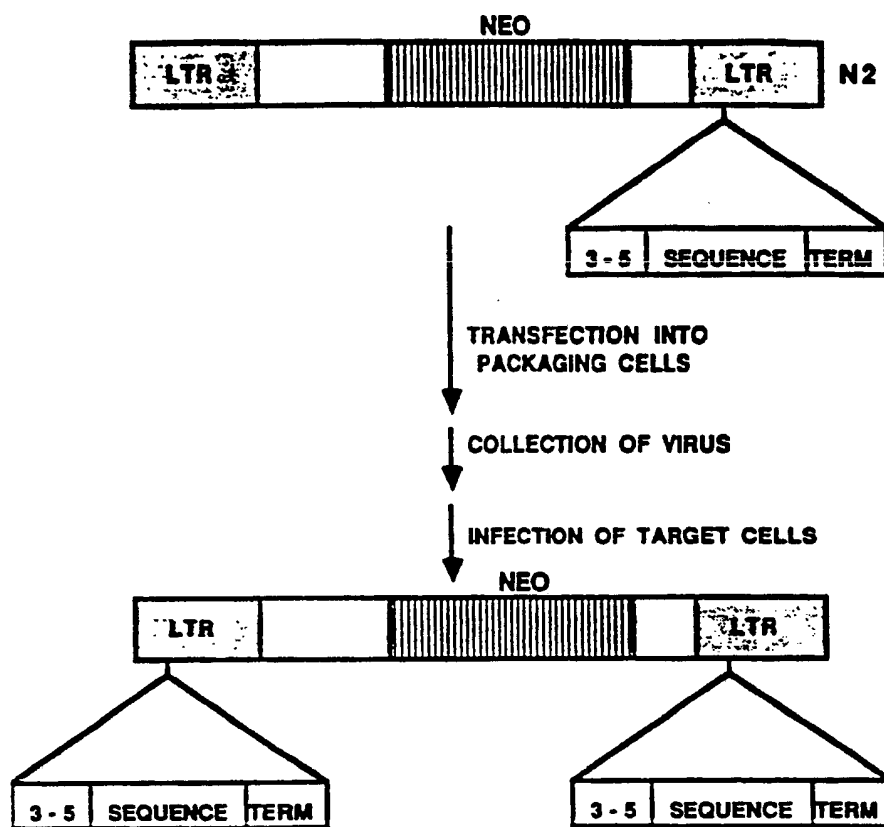


FIGURE 3

6 / 12

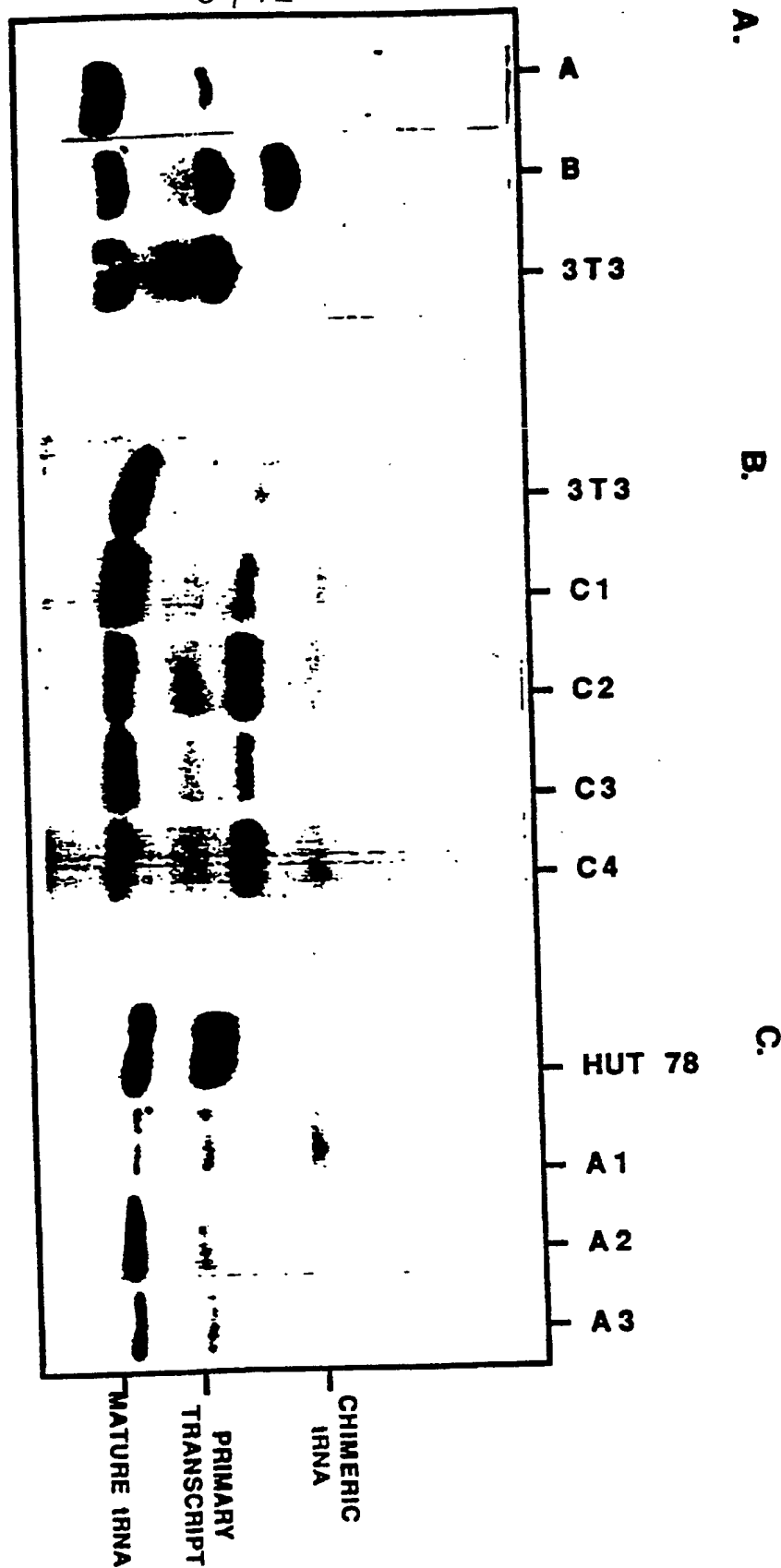


FIGURE 4

7 / 12

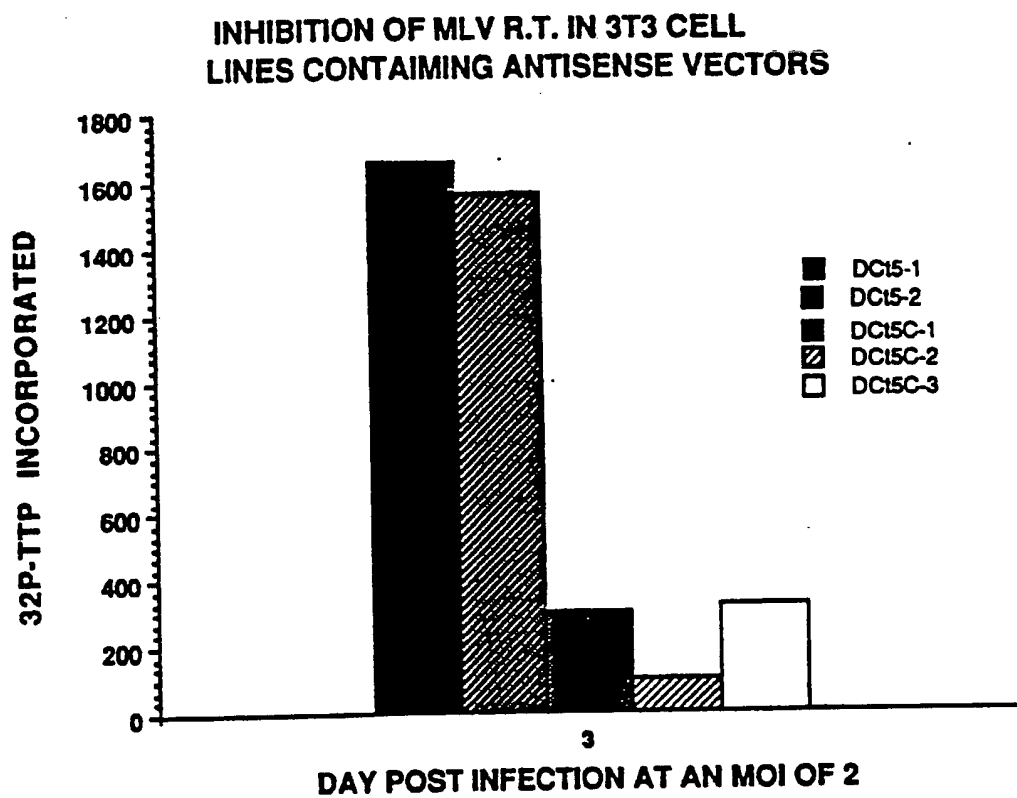
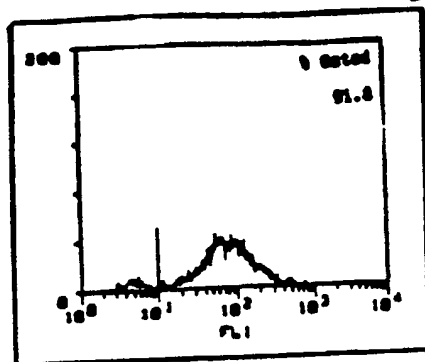


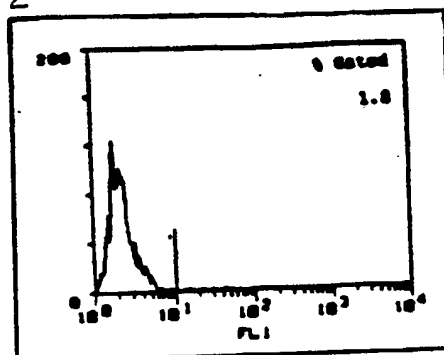
FIGURE 5

WILV + SY3



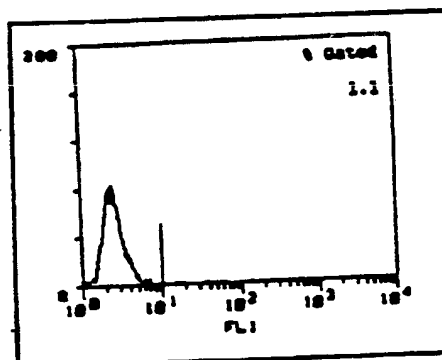
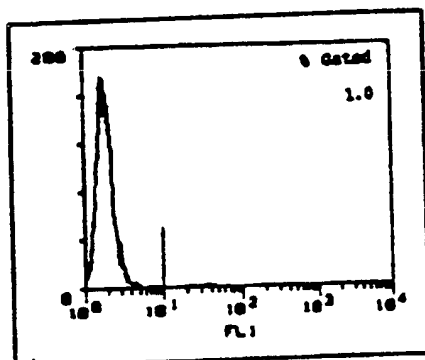
CONTROL

SY3

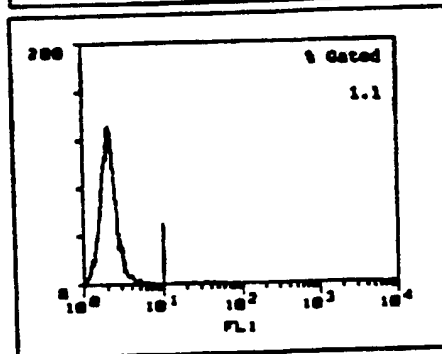
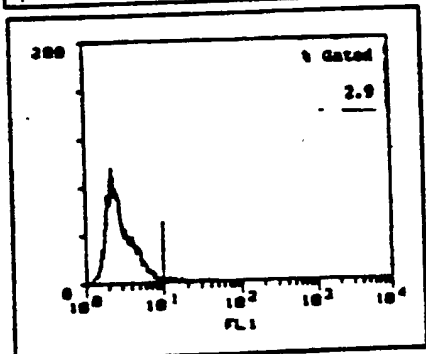


DC15C-1

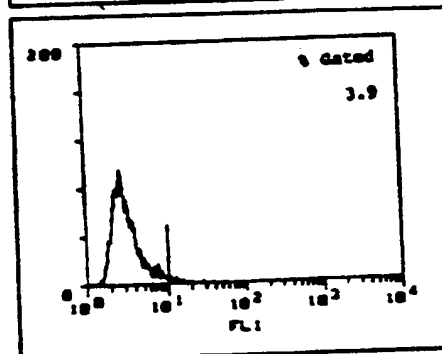
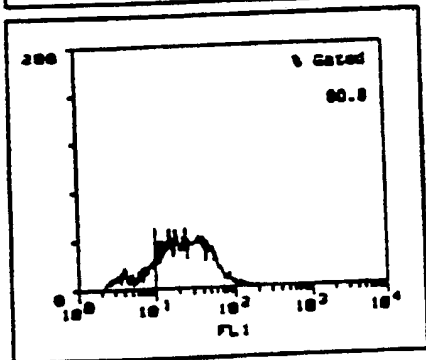
DAY 4



DAY 8



DAY 10



DAY 11

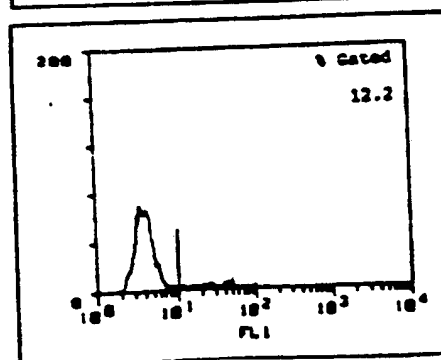
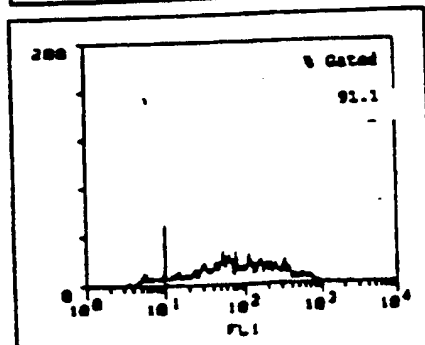


FIGURE 6

9/12

INHIBITION OF HIV R.T. IN HUT78 CELLS

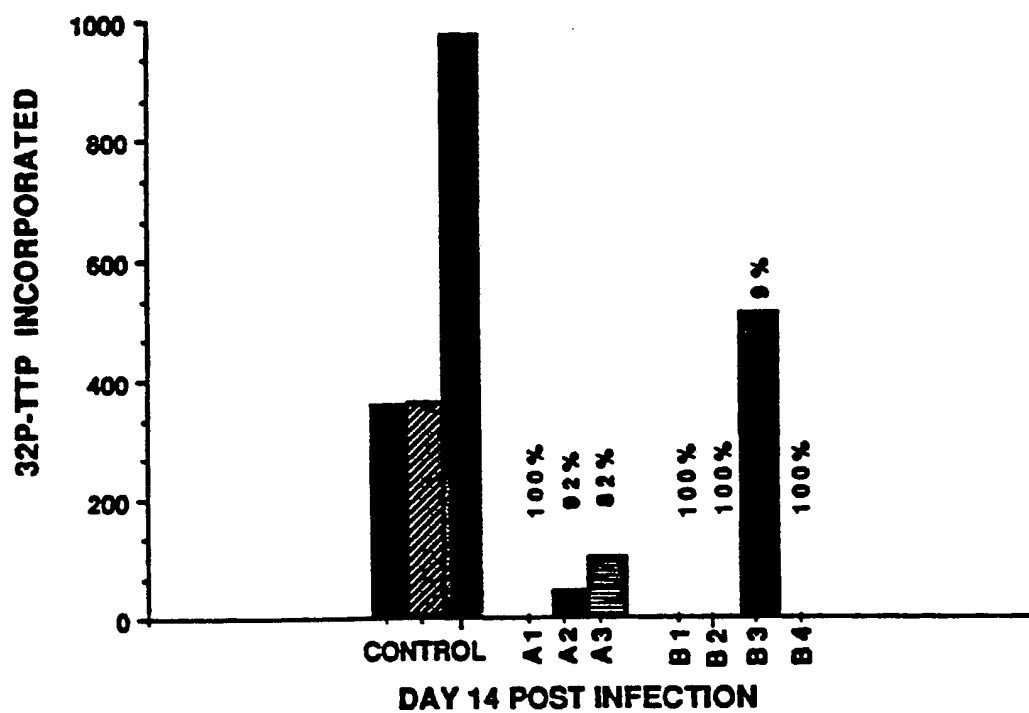
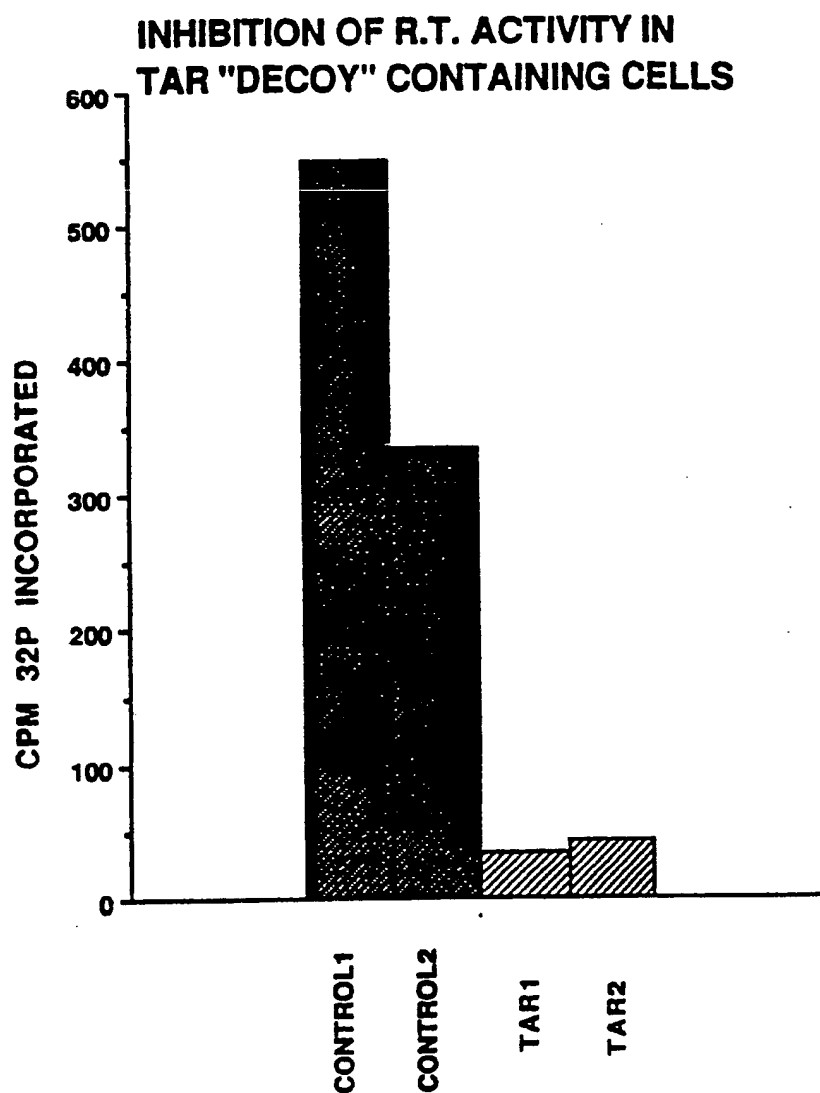


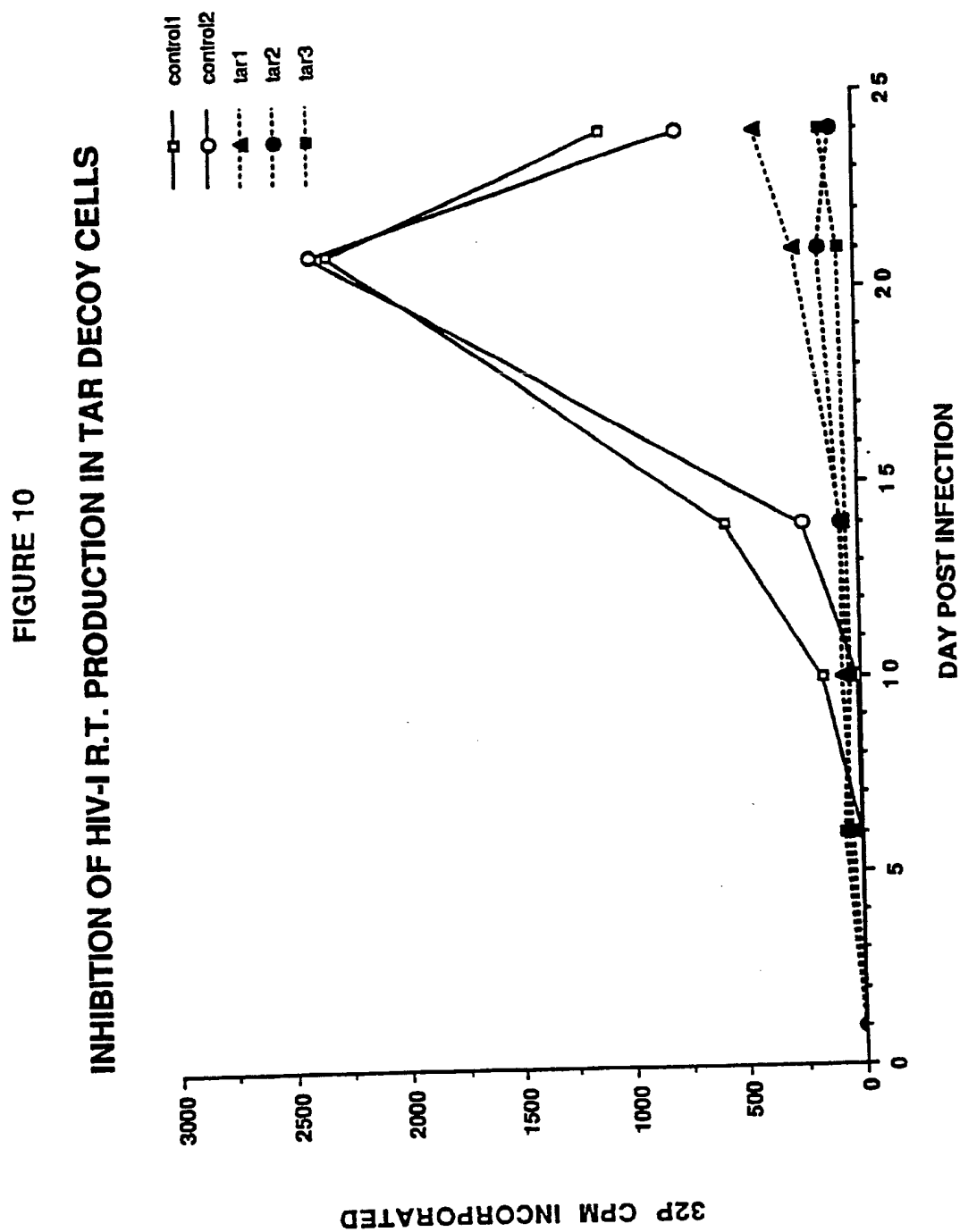
FIGURE 7

11/12

FIGURE 9



12/12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US90/02656

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ³		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC IPC(5): C12N 15/00, 7/00, 5/00; C12P 21/00, 19/30; A61K 39/12, 37/00 U.S. CL.: 435/172.3, 235, 320, 240.2, 240.4, 255, 69.1, 89; 424/89, 93		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
U.S.	435/172.3, 235, 320, 240.2, 240.4, 255, 69.1, 89 424/89, 93	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁶		
DIALOG Databases: BIOTECH (1969-1990), CAS (1969-1990)		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category ¹	Citation of Document, ¹⁴ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
	SEE ATTACHED SHEETS	
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁵</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ²	Date of Mailing of this International Search Report ³	
29 AUGUST 1990	28 SEP 1990	
International Searching Authority ¹	Signature of Authorized Officer ¹⁰	
ISA/US	BETH A. BURROUS	

Attachment to Form PCT/ISA/210 (second sheet) *1

Part III. Documents considered to be relevant

Category	Citation	Claim No.
Y	Nucl. Acid. Res., Volume 11, number 6, published 1983. D. Jolly, et al. "Elements in the long terminal repeat of murine retroviruses stable transformation by thymidine kinase gene," pp. 1855-1872. see entire document.	1-67 69-70 72-87
Y	EMBO J., Volume 6, number 10, published October 1987. P. Jennings, et al. "Inhibition of SV40 replicon function by engineered antisense RNA transcribed by RNA polymerase III" pp. 3043-3047. see entire article.	1-67 69-70 72-87
Y	J. Virol., Volume 63, number 3, published March 1989. M. Hadzopoulou-Cladaras, et al. "The <u>rev</u> (<u>trs/art</u>) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a <u>cis</u> -acting sequence in the <u>env</u> region" pp. 1265-1274. see entire article.	13-19 32-34 44-46 52-57 59-62 70-74 77,84-87
Y,P	Chemical Abstracts, Volume 111, no. 13, issued 1989, September 25 (Columbus, Ohio, U.S.A.). E. Gilboa, et al. "Retroviral gene transfer: applications to human therapy" see page 110247, column 1, the abstract no. 110249f, Adv. Exp. Biol. Med. 1988, 241 (Mol. Biol. Hemopoiesis), 29-33 (Eng).	1-67 69-70 72-87
Y	Nature, Volume 335, published 29 September 1988. D. Baltimore "Intracellular Immunization" pp. 395-396. see entire article.	87

Attachment to Form PCT/ISA/210 (second sheet) *2

- | | | |
|---|---|-------------------------|
| Y | Nature, Volume 335, published 29 September 1988.
A. Friedman, et al. "Expression of a truncated viral <u>trans</u> -activator selectively impedes lytic infection by its cognate virus" pp. 452-454. see entire article. | 1-87 |
| Y | Nucl. Acid. Res., Volume 12, number 2, published 1984.
S. Adeniyi-Jones, et al. "Generation of long read-through transcripts <u>in vivo</u> and <u>in vitro</u> by deletion of 3' termination and processing sequences in the human tRNA (i)(met) gene" pp. 1101-1115. see entire article. | 1-87 |
| Y | Cell, Volume 43, published December 1985. J. Tobian, et al. "tRNA nuclear transport: defining the critical regions of human tRNA (i)(met) by point mutagenesis" pp. 415-422. see entire article. | 1-87 |
| Y | J. Virol., Volume 63, number 2, published February 1989.
T. von Ruden, et al. "Inhibition of human T-cell leukemia virus type I replication in primary human T cells that express antisense RNA" pp. 677-682. see entire article. | 1-87 |
| Y | Nature, Volume 323, published 25 September 1986.
J. Zarling, et al. "T-cell responses to human AIDS virus in macaques immunized with recombinant virus" pp. 344-346. see entire article. | 77,
84-86 |
| Y | US, A, 4,497,796 (SALSER ET AL.) 05 February 1985.
See entire document. | 64-67
69,70
72-75 |
| Y | Cold Spring Harbor Sym. on Mol. Biol., Volume LI.
published 1986. A. Miller, et al. "Transfer of genes into human somatic cells using retrovirus vectors" pp. 1013-1019. see entire article. | 64-67
69,70
72-76 |

Attachment to Form PCT/ISA/210 (second sheet) *3

- Y EMBO J., Volume 6, number 2, published February 1987. 68,71
N. Takamatsu, et al. "Expression of bacterial chloram-
phenicol acetyltransferase gene in tobacco plants
mediated by TMV-RNA" pp. 307-311. see entire article.

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/15, 15/62, C07H 21/04 C07K 13/00, C12P 21/00 // A61K 37/02 (C12N 15/15 C12R 1/865)	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 90/13646 (43) Date de publication internationale: 15 novembre 1990 (15.11.90)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00306 (22) Date de dépôt international: 27 avril 1990 (27.04.90) (30) Données relatives à la priorité: 89/05687 28 avril 1989 (28.04.89) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 16, rue Henri-Régault, F-92400 Courbevoie (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ACHSTETTER, Tilman [DE/DE]; Uhlandweg 11, D-7602 Oberkirch (DE). NGUYEN, Martine [FR/FR]; 21, rue du Paradis, F-67670 Wittersheim (FR). LEMOINE, Yves [FR/FR]; 4, rue des Alisiers, F-67100 Strasbourg (FR). REICH-HART, Jean-Marc [FR/FR]; 34, rue de Rotterdam, F-67000 Strasbourg (FR).	(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: APPLICATION OF NOVEL DNA FRAGMENTS AS A CODING SEQUENCE FOR A SIGNAL PEPTIDE FOR THE SECRETION OF MATURE PROTEINS BY RECOMBINANT YEAST, EXPRESSION CASSETTES, TRANSFORMED YEASTS AND CORRESPONDING PROCESS FOR THE PREPARATION OF PROTEINS (54) Titre: APPLICATION DE NOUVEAUX FRAGMENTS D'ADN EN TANT QUE SEQUENCE CODANT POUR UN PEPTIDE SIGNAL POUR LA SECRETION DE PROTEINES MATURES PAR DES LEVURES RECOMBINANTES, CASSETTES D'EXPRESSION, LEVURES TRANSFORMEES ET PROCEDE DE PREPARATION DE PROTEINES CORRESPONDANT (57) Abstract The invention relates to new DNA fragments and to their application as a DNA coding fragment for a signal peptide which can be used for the secretion of proteins, said peptide including a sequence of amino-acids which show a degree of correspondence of at least 60 % with the sequence of amino-acids (I) or (II), preferably with the sequence (II). The sequences (I) and (II) are as follows: (I) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln. (II) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-Val-Ser-Ala. (57) Abrégé L'invention concerne de nouveaux fragments d'ADN et leur application à titre de fragment d'ADN codant pour un peptide signal utile pour la sécrétion de protéines, ce peptide comprenant une séquence d'acides aminés qui présente un degré d'homologie d'au moins 60 % avec la séquence d'acides aminés (I) ou (II), de préférence avec la séquence (II). Les séquences (I) et (II) sont comme suit: (I) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln. (II) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-Val-Ser-Ala.		

+ Voir verso

DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Monaco
AU	Australie	FI	Finlande	MG	Madagascar
BB	Barbade	FR	France	ML	Mali
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	HU	Hongrie	NO	Norvège
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
DE	Allemagne, République fédérale d'	LU	Luxembourg	TG	Togo
DK	Danemark			US	Etats-Unis d'Amérique

5

APPLICATION DE NOUVEAUX FRAGMENTS D'ADN EN TANT QUE
SEQUENCE CODANT POUR UN PEPTIDE SIGNAL POUR LA SECRETION
DE PROTEINES MATURES PAR DES LEVURES RECOMBINANTES,
CASSETTES D'EXPRESSION, LEVURES TRANSFORMEES ET PROCEDE DE
10 PREPARATION DE PROTEINES CORRESPONDANT.

15

La présente invention a pour objet de nouveaux fragment d'ADN et leur
utilisation en tant que fragments d'ADN codant pour un peptide signal utile pour
la sécrétion de protéines hétérologues par des cellules eucaryotes (animales ou
végétales) ou procaryotes (bactéries), plus particulièrement des levures telles que
des souches de *Saccharomyces*.

20

Lors de la préparation d'une protéine hétérologue par les techniques de
l'ADN recombinant, un des objectifs souvent poursuivis est l'obtention d'un
produit qui est sécrété dans le milieu de culture des cellules qui synthétisent la
protéine hétérologue. En effet, dans le cas notamment de la préparation d'une
protéine d'intérêt industriel, destinée à être produites en grande quantité, il est
souhaitable, afin qu'elle conserve les propriétés désirées, que la protéine soit
produite sous forme mature, c'est à dire dépourvue de tout acide aminé ou
séquence peptidique supplémentaire demeurée fusionnée à la protéine. Par ailleurs,
25 il peut être intéressant qu'elle soit sécrétée dans le milieu de culture afin de
faciliter les opérations de récupération et purification.

Les protéines qui sont sécrétées par une cellule, en particulier par une cellule eucaryote, sont très généralement synthétisées sous forme d'un précurseur polypeptidique comprenant un fragment correspondant à la protéine mature (forme active) et un fragment N-terminal dit fragment "pré", aussi appelé peptide signal, qui intervient dans le mécanisme de sécrétion de la protéine par la cellule. En outre, ce précurseur polypeptidique peut comprendre un ou des fragments additionnels, appelés fragments "pro". Dans ce dernier cas, le précurseur polypeptidique est appelé précurseur "pré-pro" ou premier précurseur. Un fragment "pro" est, dans la majorité des cas, inséré entre le peptide signal et le fragment correspondant à la protéine mature, bien que ceci ne soit pas une règle absolue.

Un peptide signal initie (i) l'insertion de la protéine dans la membrane cellulaire, (ii) la translocation de la protéine au travers de la membrane cellulaire, ou (iii) l'entrée de la protéine dans le réticulum endoplasmique de la cellule en vue de la sécrétion de la protéine par la voie du réticulum endoplasmique. Une fois que le peptide signal a rempli son office, il est normalement détaché par clivage protéolytique pour libérer une protéine mature ou un deuxième précurseur appelé précurseur "pro" qui, tout comme le premier précurseur, n'a pas d'activité biologique, ou qui n'a pas l'activité complète de la protéine mature.

Un fragment "pro" est utile dans la mesure où il bloque ou modifie l'activité de la protéine, permettant ainsi de protéger la cellule contre les effets toxiques éventuels de la protéine ou de protéger la protéine contre d'éventuelles modifications ou dégradations. Il peut aussi intervenir dans une certaine mesure dans le mécanisme de sécrétion. En fin du processus de sécrétion, le fragment "pro" du deuxième précurseur est détaché par clivage protéolytique pour libérer

une protéine mature (forme active).

5 A la jonction du fragment "pré" et du fragment "pro", ainsi que à la jonction du fragment "pro" et du fragment correspondant à la protéine mature, doit se trouver un site de clivage protéolytique qui est reconnu par une des protéases de la cellule dans laquelle la protéine est synthétisée. Ce site de clivage protéolytique est généralement constitué d'une séquence de 2 ou 3 acides aminés ou plus (appelée par la suite séquence de protéolyse) qui est accessible à la protéase sur le précurseur "pro" et qui, si elle existe sur le fragment correspondant à la protéine
10 mature, n'est pas accessible. Trois cas sont a priori possibles, illustrés ci-dessous en référence à la jonction des fragments "pré" et "pro":

- ou bien la protéase coupe en tête de séquence et, par conséquent, la séquence de protéolyse doit se lire sur le fragment "pro";
- ou bien la protéase coupe en queue de séquence et, par conséquent, la
15 séquence de protéolyse doit se lire sur le fragment "pré";
- ou bien la protéase coupe en milieu de séquence et, par conséquent, la séquence de protéolyse doit se lire à cheval sur les fragments "pré" et "pro".

20 Ces considérations s'appliquent bien sur de manière similaire au site de clivage placé à la jonction du fragment "pro" et du fragment correspondant à la protéine mature.

25 Pour la construction de précurseurs synthétiques par les méthodes du génie génétique on peut être amené à utiliser des fragments naturels (c'est-à-dire tels que trouvés dans la nature) et à insérer en bonne place un nouveau site de clivage protéolytique ou certains acides aminés de manière à reconstituer un nouveau site

de clivage protéolytique en association avec les fragments, ce nouveau site de clivage étant bien sur reconnu par une des protéases de la cellule dans laquelle le précurseur synthétique est exprimé.

5 Un exemple du type de synthèse et du mode de sécrétion décrit ci-dessus est illustré par le cas de la phéromone sexuelle α de la levure *S. cerevisiae*, aussi appelé facteur α (codé à partir du gène MF α 1 ou MF α 2). Le Facteur α est en effet synthétisé sous forme de précurseur "pré-pro" tel que décrit dans Kurjan et Herskowitz, Cell (1982) 30: 933. La séquence d'acides aminés du fragment "pré"

10 du précurseur du Facteur α est Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala tandis que celle du fragment "pro" du précurseur du Facteur α est Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile

15 Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Asp.

De manière surprenante, il a maintenant été trouvé que l'extrémité N-terminale du précurseur d'une enzyme de levure, cette extrémité N-terminale ayant la séquence d'acides aminés :

20 Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-Val-Ser-Ala, peut être utilisée à titre de peptide signal pour la sécrétion de protéines hétérologues, ainsi que différents variants de cette extrémité N-terminale. Par "protéine hétérologue" on signifie une protéine qui n'est pas produite naturellement par la cellule hôte ou bien qui est codée par une séquence qui ne

25 provient pas de la cellule hôte.

Conformément à ceci, la présente invention a pour objet un fragment d'ADN

isolé qui code pour un peptide dont la séquence d'acides aminés présente un degré d'homologie d'au moins 60%, de manière préférentielle d'au moins 80%, avec la séquence d'acides aminés (I) ou (II), de préférence avec la séquence (II). Les séquences (I) et (II) sont comme suit:

- 5 (I) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln.
 (II) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-Val-Ser-Ala.

10 Par "fragment d'ADN isolé" on signifie un fragment d'ADN dont l'extrémité 3' n'est pas liée par liaison covalente à un fragment d'ADN codant pour une enzyme ayant une activité β -1,3 glucanase telle que en particulier décrite dans Klebl & Tanner, J. Bact, Nov 1989, 171: 6259.

15 Plus particulièrement, un fragment d'ADN selon l'invention code pour un peptide comprenant la séquence d'acides aminés (III) suivante :

(III) $R_1-R_2-R_3$ -Thr-Thr- R_4 -Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-
 1 5 10
 Phe-Thr-Ala- R_5 - R_6

20 15 19
 dans laquelle:

- 25 R_1 est un acide aminé sélectionné parmi Arg et Lys,
 R_2 et R_6 sont chacun un acide aminé sélectionné de manière indépendante parmi Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr et Val,
 R_3 et R_5 sont chacun un acide aminé sélectionné de manière indépendante parmi Asp, Gly, Asn, Pro et Ser, et
 R_4 est un acide aminé sélectionné parmi Val, Leu, Ala, Cys, Phe, Ile et

Met.

De manière préférée, un fragment d'ADN selon l'invention code pour un peptide comprenant la séquence d'acides aminés (IV) suivante:

5 (IV) R_1 - R_2 - R_3 -Thr-Thr- R_4 -Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-
Ala- R_5 - R_6 - R_7

dans laquelle :

R_1 est un acide aminé sélectionné parmi Arg et Lys,

10 R_2 et R_6 sont chacun un acide aminé sélectionné de manière indépendante
parmi Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp,
Tyr et Val,

R_3 et R_5 sont chacun un acide aminé sélectionné de manière indépendante
parmi Asp, Gly, Asn, Pro et Ser,

15 R_4 est un acide aminé sélectionné parmi Val, Leu, Ala, Cys, Phe, Ile et
Met,

R_7 est une séquence de protéolyse.

R_7 est préférentiellement une séquence de protéolyse R_8 - R_9 - R_{10} dans
laquelle :

20 R_8 est un acide aminé sélectionné parmi Ala, Val, Ser, Cys, Gly, Ile, Leu,
Thr,

R_9 est un acide aminé sélectionné parmi Ala, Arg, Cys, Gln, Gly, His, Ile,
Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr et Val et

25 R_{10} est un acide aminé sélectionné parmi Ala, Cys, Gly, Leu, Pro, Gln, Ser
et Thr.

Selon l'invention, un fragment d'ADN préféré code pour un peptide
comprenant une séquence d'acides aminés sélectionnée parmi les séquences

d'acides aminés (V), (VI), (VII) et (VIII) suivantes :

(V) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln

5 (VI) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln

(VII) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-R₇

dans laquelle R₇ est tel que défini ci-dessus.

10 (VIII) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-R₇

dans laquelle R₇ est tel que défini ci-dessus.

De manière tout à fait préférée, R₇ est une séquence dans laquelle R₈ est Val, R₉ est Ser et R₁₀ est Ala.

15

Il est tout particulièrement préféré qu'un fragment d'ADN selon l'invention ait pour séquence nucléotidique l'une des séquences (IX), (X), (XI) et (XII) suivantes :

20 (IX) CGT TTC TCT ACT ACA GTC GCT ACT GCA GCT ACT GCG CTA
TTT TTC ACA GCC TCC CAA,

(X) CGT TTC TCT ACT ACA CTC GCT ACT GCA GCT ACT GCG CTA
TTT TTC ACA GCC TCC CAA,

(XI) CGT TTC TCT ACT ACA GTC GCT ACT GCA GCT ACT GCG CTA
TTT TTC ACA GCC TCC CAA GTT TCA GCT,

25 (XII) CGT TTC TCT ACT ACA CTC GCT ACT GCA GCT ACT GCG CTA
TTT TTC ACA GCC TCC CAA GTT TCA GCT.

Les peptides codés par les fragment d'ADN selon l'invention comprennent une région hydrophobe possédant une structure en hélice α comprise entre l'acide aminé en position 3 et l'acide aminé en position 18. Cette structure contribue à les rendre aptes à une utilisation comme peptide signal. Il est connu que la partie hydrophobe des séquences signal est composée en majorité des acides aminés Ala, Cys, Phe, Ile, Leu, Met, Val. On peut donc aussi prévoir que certaines modifications d'acides aminés n'engendrent pas de modification dans l'aptitude du peptide signal à jouer son rôle.

Sous un autre aspect, l'invention propose par conséquent l'application d'un fragment d'ADN selon l'invention à titre de fragment d'ADN codant pour un peptide signal utile pour la sécrétion d'une protéine hétérologue par une cellule hôte dans laquelle la protéine hétérologue est synthétisée. D'une manière générale, l'invention peut être mise en oeuvre dans une cellule procaryote ou eucaryote, de préférence dans cette dernière. La cellule eucaryote peut être par exemple, une cellule de mammifère ou de levure. De manière tout à fait préférée, la sécrétion d'une protéine hétérologue à l'aide d'un peptide signal codé par un fragment selon l'invention est réalisée par une cellule de levure, par exemple du genre *Saccharomyces*, plus particulièrement de l'espèce *S. cerevisiae*.

Bien entendu, en tant que fragments d'ADN codant pour un peptide signal, les fragments d'ADN selon l'invention seront précédés d'un codon d'initiation de la traduction, généralement d'un codon codant pour une méthionine, en particulier un ATG.

Les fragments d'ADN selon l'invention peuvent être utilisés pour la construction d'une cassette d'expression d'une protéine, précédés du codon

d'initiation, seuls ou en combinaison avec d'autres composants, par exemple un fragment "pro". Ces fragments d'ADN peuvent être préparés par synthèse chimique, au moyen d'un synthétiseur d'oligonucléotides par une technique connue de l'homme du métier.

5

L'invention concerne également une cassette d'expression d'une protéine hétérologue comprenant un fragment d'ADN selon l'invention à titre de fragment d'ADN codant pour le peptide signal de la dite protéine hétérologue. De manière détaillée, une cassette d'expression selon l'invention qui comporte donc l'information nécessaire à la sécrétion d'une protéine hétérologue mature comprend, de façon séquentielle, au moins:

10

15

- a) un fragment d'ADN comportant des signaux d'initiation de transcription et de traduction,
- b) un fragment d'ADN selon l'invention,
- c) un fragment d'ADN codant pour une protéine hétérologue mature (avec codon de fin de traduction).

20

Dans une première variante, on peut fusionner directement le fragment b) en phase avec le fragment c), dans la mesure où, à la jonction du fragment b) et du fragment c), il existe une séquence d'ADN codant pour un site de clivage protéolytique de manière à permettre la libération d'une protéine mature en fin du processus d'expression et de sécrétion.

De manière préférée, la séquence d'ADN codant pour un site de clivage protéolytique se lit sur le fragment b).

25

Dans une deuxième variante, une cassette d'expression selon l'invention comprend en outre un fragment d'ADN b') codant pour un fragment peptidique

"pro". Ce fragment b') est fusionné en phase avec le fragment b) et le fragment c), dans la mesure où, à la jonction des fragments b) et b') d'une part et des fragments b') et c) d'autre part, il existe une séquence d'ADN codant pour un site de clivage protéolytique.

5

De nombreux fragments b') peuvent être utilisés dans les cassettes selon l'invention. En particulier, divers fragments b') peuvent être construits de manière synthétique. A titre d'exemple, on indique ci-dessous la construction d'un fragment b') synthétique à partir de la séquence d'ADN codant pour le fragment "pro" du précurseur du Facteur α . Cette séquence peut être utilisée en totalité ou en partie. Dans un mode de réalisation particulier, on utilise cette séquence déléetée de la partie codant pour les acides aminés en position 3 à 42 sur le fragment "pro"; c'est-à-dire la séquence codant pour : Ala Pro Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Asp. Pour former le fragment b'), cette dernière séquence d'ADN est suivie d'une séquence codant pour (i) un peptide comprenant un site de clivage protéolytique ou (ii) un site de clivage protéolytique, ce dernier mode de réalisation étant préféré. Tout particulièrement, ce dernier site de clivage est Lys-Arg ou Arg-Arg, celui-ci étant reconnu par l'endopeptidase de levure yscF qui est codée par le gène KEX2 et qui coupe au niveau de l'extrémité C-terminale du dipeptide Lys-Arg ou Arg-Arg. En résumé, un fragment b') particulier code pour Ala Pro Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Asp Lys Arg.

10

15

20

25

La séquence a) comprend en particulier un promoteur fonctionnel dans la cellule dans laquelle on souhaite synthétiser la protéine hétérologue codée par le fragment c), de préférence un promoteur fonctionnel chez la levure. On peut citer par exemple des promoteurs constitutifs de levure dont la fonctionnalité a été

confirmée par la transcription de gènes codant pour des protéines hétérologues codant pour des protéines hétérologues tels que les promoteurs PGK, ENO1, MF α 1, ou encore des promoteurs inductibles, tels que PH05, GAL1. Par exemple, lorsqu'on utilise dans la cassette d'expression des éléments du gène MF α 1 de
5 levure, on pourra utiliser le promoteur du gène MF α 1.

Enfin, les cassettes d'expression peuvent aussi comprendre un fragment d'ADN d) comportant des signaux de terminaison de la transcription, de préférence fonctionnels chez la levure, par exemple celui du gène PGK.
10

De façon générale, une cassette d'expression selon l'invention peut être introduite dans une cellule procaryote ou eucaryote, de préférence eucaryote telle que cellule de mammifère ou de levure; une cellule de levure étant tout particulièrement préférée. Cette introduction peut être réalisée en plaçant la
15 cassette dans un plasmide à replication autonome ou dans une construction destinée à l'intégration pour être introduite directement dans le génome de la levure, de manière à obtenir dans les deux cas une cellule transformée.

Lorsque le plasmide est autonome, il comportera des éléments assurant sa
20 partiton et sa réplication; par exemple, une origine de réplication telle que celle du plasmide 2 μ de levure. En outre, le plasmide pourra comporter des éléments de sélection tels que le gène URA3 ou LEU2 qui assurent la complémentation de levure ura3 ou leu2. En particulier, on pourra avantageusement utiliser le gène URA3 délété de son promoteur (URA3-d).

25

Ces plasmides peuvent également comporter des éléments assurant leur réplication dans les bactéries, lorsque le plasmide doit être un plasmide navette,

par exemple une origine de répllication telle que celle du pBR322, un gène marqueur de sélection tel que Amp^R et/ou d'autres éléments connus de l'homme du métier.

5 En accord avec ce qui précède, la présente invention concerne également une cellule transformée par (i) un fragment d'ADN selon l'invention ou (ii) une cassette d'expression selon l'invention, soit insérée dans un plasmide, soit intégrée dans le génome de la cellule.

10 Lorsque le promoteur est celui du gène MF α 1, la cellule de levure transformée est de préférence de type sexuel MAT α . On utilisera, par exemple, une souche de génotype ura3 ou leu2 ou autre, complémentée par le plasmide pour assurer le maintien du plasmide dans la levure par une pression de sélection appropriée.

15 Enfin, l'invention a pour objet un procédé de préparation d'une protéine hétérologue, caractérisé en ce que l'on cultive une cellule selon l'invention et, en ce que l'on récupère la dite protéine dans le milieu de culture. Ce procédé s'applique à la préparation de toute protéine de nature hétérologue. Parmi ces protéines, on peut notamment citer l'hirudine ou des défensines, par exemple la
20 défensine A.

 Plus particulièrement, l'invention concerne un procédé de sécrétion de l'hirudine sous forme mature à partir des souches de levures transformées selon l'invention.

25

 L'invention s'applique tout particulièrement bien à la production d'hirudine, c'est pourquoi un des exemples illustratifs de l'invention concerne cette

protéine. En effet l'hirudine, dont la source principale se trouve dans les glandes salivaires des sangsues médicinales est un inhibiteur très spécifique et très efficace de la thrombine. Il s'agit donc d'un agent thérapeutique très intéressant dont l'utilisation en clinique exige une très grande pureté du produit, et qui est donc un
5 candidat intéressant à la production par génie génétique.

Un certain nombre de variants naturels de l'hirudine ont été identifiés et désignés par HV1, HV2, HV3. Par la suite ces variants naturels ainsi que d'autres analogues ont été préparés par génie génétique dans diverses cellules hôtes,
10 comme cela est décrit par exemple dans les publications européennes de brevet EP-A-0200655, EP-A-0273800 au nom de la Demanderesse. La comparaison de l'hirudine synthétisée par *Escherichia coli* (*E. coli*) et par une levure du genre *S. cerevisiae* a montré que l'hirudine synthétisée par *E. coli* reste intracellulaire et doit donc être purifiée à partir d'un très grand nombre de polypeptides de *E. coli*.
15 Il est donc particulièrement intéressant de pouvoir faire exprimer un gène de l'hirudine dans la levure de façon à obtenir une hirudine sécrétée sous forme mature, et sans que la levure ne produise de substances pyrogènes ou toxiques pour l'homme.

20 L'invention s'applique donc à toutes les molécules d'hirudines, c'est à dire, variants naturels de l'hirudine tel quels ou ayant subi une ou plusieurs mutations tout en conservant leur activité antithrombotique, ce dernier type de variant étant appelé analogue. Les exemples ci-après concerneront plus particulièrement l'analogue désigné par rHV2Lys47 (pour recombinant variant HV2 ayant subi une
25 mutation de l'acide aminé Asp en position 47 en acide aminé Lys), décrit dans la publication de brevet EP-A-02738000 déjà mentionnée.

L'invention s'applique également à la production de défensines. Les défensines, aussi appelées phormicines, sont des peptides originellement extraits de l'hémolymph des certains insectes, les Diptères, qui ont une activité bactéricide sur les germes Gram-positifs. Ces défensines sont plus amplement
5 décrites dans la demande de brevet européenne EP-A- 349 451. La défensine A est un peptide basique ayant pour séquence Ala Thr Cys Asp Leu Leu Ser Gly Thr Gly Ile Asn His Ser Ala Cys Ala Ala His Cys Leu Leu Arg Gly Asn Arg Gly Gly Tyr Cys Asn Gly Lys Gly Val Cys Val Cys Arg Asn. La défensine B ne diffère de la défensine A que par l'acide aminé en position 32 où une arginine remplace
10 une glycine.

Les exemples ci-après permettront de mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention. Ces exemples seront illustrés par les figures suivantes :

- 15 - la figure 1 représente la structure schématique du plasmide pTG2958.
- la figure 2 représente la structure schématique des vecteurs M13TG3839 et M13TG3841. Pour M13TG3839 les cadres hachurés aux extrémités correspondent à M13TG103 et pour M13TG3841 à M13TG3149.
- la figure 3 représente la structure schématique du vecteur M13TG3845. Le
20 cadre hachuré correspond à M13TG3149.
- la figure 4 représente la structure schématique du plasmide pTG3828.
- la figure 5 représente la structure schématique du plasmide pTG3864.

EXEMPLE 1 : Construction des vecteurs d'expression de l'hirudine :
pTG3864, pTG3867, pTG3894 et pTG3884.

A. Construction du vecteur M13TG3845

- 5 Le plasmide pTG2958 (figure 1) est peu différent du plasmide pTG1833 décrit dans la publication européenne de brevet EP-A-252854 porteur de la séquence codante pour rHV2Asp47. Le plasmide pTG2958 ne contient pas le site de restriction HindIII artificiellement introduit. Le plasmide pTG2958 contient :
- 10 - un fragment de 1217 paires de bases correspondant à la région 5' du gène MF α 1 (contenant le promoteur, la séquence codant pour le peptide signal, la région "pro" et une séquence codant pour le peptide Lys-Arg), et 4 paires de bases (site BglII^o, traitement par Klenow),
 - un fragment de 234 paires de bases contenant l'ADN complémentaire de rHV2Lys47,
 - 15 - un fragment de 243 paires de bases comprenant le terminateur PGK de levure,
 - le fragment PvuII-EcoRI de pBR322 comprenant entre autres l'origine de réplication de ce plasmide et le gène de résistance à l'ampicilline (2292 paires de bases),
 - le fragment EcoRI-HindIII du plasmide 2 μ de la levure (forme B), contenant
 - 20 le gène LEU2 de levure, sous forme délétée et inséré dans le site PstI,
 - un fragment HindIII-SmaI du gène URA3 de levure.

Le fragment NcoI-NcoI du vecteur pTG2958 qui porte les séquences LEU2-d, 2 μ et URA3 est remplacé par le fragment NcoI-NcoI de pTG2800 décrit dans la publication européenne de brevet EP-A-O268501 qui porte les séquences

25 du plasmide 2 μ et du gène URA3 délété de son promoteur (URA3-d) pour donner pTG2877.

Le vecteur M13TG3839 (figure 2) dérive de M13TG103 [Kieny, M.P. et

al. (1983) Gene 26, 91-99] dans lequel le fragment HindIII-HindIII de pTG2877 est introduit dans le même site. Un site de restriction SalI est introduit dans ce vecteur en aval du codon de terminaison de traduction de la région codant pour rHV2Lys47 par mutagenèse dirigée à l'aide de l'oligonucléotide suivant :

- 5 5' CAATGAAAAATGGTCGACTATCAATCATAG pour donner M13TG3839
SalI. Un site de restriction SphI est alors introduit en amont de la cassette d'expression en éliminant la séquence URA3-d par mutagenèse dirigée à l'aide de l'oligonucléotide suivant :
5' GACGGCCAGTGAATTGGCATGCTATTGATAAGATTAAAG pour donner
10 M13TG3840.

- Le vecteur M13TG131 [Kieny M.P. *et al.* (1983) Gene 26, 91-99] est clivé par PstI, les extrémités rendues franche par traitement à l'aide du fragment Klenow de l'ADN polymérase I pour être ensuite reliqué sur lui même pour donner M13TG3160. Ce vecteur est ensuite clivé par SmaI et EcoRV puis reliqué
15 pour donner M13TG3149.

Le fragment SphI-SalI de M13TG3840 (décrit ci-dessus) portant la cassette d'expression de rHV2Lys47 (sans séquence terminatrice de transcription) est introduit dans le site SphI-SalI de M13TG3149 pour donner M13TG3841 (figure 2).

- 20 La séquence codant pour les acides aminés en position 3 à 42 sur le fragment "pro" du précurseur de MF α 1 est éliminée de M13TG3149 par mutagenèse dirigée et un site de restriction SmaI introduit en utilisant l'oligonucléotide suivant :

- 5' CTCCGCATTAGCTGCTCCCGGGTTATTGTTTATAAAT, pour donner ce que
25 l'on appelle par la suite une séquence "pro" délétée.
On obtient ainsi M13TG3842. Un site de restriction BamHI détruisant l'ATG du précurseur du facteur α est introduit dans ce vecteur par mutagenèse dirigée avec

l'oligonucléotide suivant :

5' AATATAAACGATTAAAAGGATCCGATTTCCTTCAATTTT

On obtient alors M13TG3843. Après phosphorylation, les oligonucléotides suivants:

5' GATCCGTTTCTCTACTACAGTCGCTACTGCAGCTACTGCGCTATT
GCAAAGTGATGATGTCAGCGATG 5'

et

5' TTTCACAGCCTCCCAAGTTTCAGCTGCTCCC
ACGTCGATGACGCGATAAAAAGTGTGCGAGGGTTCAAAGTCGACGAGGG 5'
sont insérés dans le vecteur M13TG3843 coupé par BamHI et SmaI introduisant ainsi la séquence XI donc sans ATG. De manière à restaurer l'ATG, le site BamHI est éliminé par mutagenèse dirigée en utilisant l'oligonucléotide suivant :

5' AATATAAACGATTAAAAGAATGCGTTTCTCTACTACAGTC

pour donner le vecteur M13TG3845 (figure 3) qui comporte :

- le promoteur du gène MF α 1, suivi d'un codon ATG, en tant que fragment a)
- la séquence XI en tant que fragment b),
- la séquence "pro" délétée du gène MF α 1, suivi des codons codant pour Lys-Arg en tant que fragment b'),
- la séquence codant pour rHV2Lys47 en tant que fragment c),
- une partie du vecteur M13TG3149.

B. Construction du plasmide pTG3864

Le plasmide pTG848 décrit dans la publication européenne de brevet EP-A-0252854 est digéré par BglII puis religué pour donner pTG2886. Le grand fragment HindIII-EcoRI de pTG2886 est ligué en présence de ligase T4 au fragment HindIII-EcoRI de 2,1 kb du plasmide pFL1 [Parent, S.A. *et al.* (1985) *Yeast* 1, 83-138] qui porte la séquence du plasmide 2 μ de *S. cerevisiae* pour donner le plasmide pTG2886 LEU2-d, URA3-d. Le fragment HindIII de 0,9 kb du

plasmide pTG2800 décrit dans la publication européenne de brevet EP-A-0258501 portant le gène URA3-d est alors inséré dans le site HindIII de ce plasmide pour donner pTG2886 URA3-d, delta LEU2-d. Le fragment SmaI-BglII de M13TG131 [Kieny *et al.* (1983) *Gene* 26, 91-99] qui possède plusieurs sites de restriction est
5 ensuite introduit dans ce plasmide pour donner pTG3828 (figure 4) qui comporte:

- la séquence du gène URA3 déléetée de son promoteur (URA3-d),
- des sites de restriction venant de M13TG131 permettant l'insertion des éléments de l'expression d'un gène hétérologue, rHV2Lys47 dans le cas présent,
- le terminateur de transcription du gène PGK de levure
- 10 - un fragment de pBR322 qui permet la répllication et la sélection chez *E. coli*,
- un fragment du plasmide 2 μ qui possède les éléments structuraux nécessaires à la répllication et à l'équipartition mitotique dans la levure.

Le fragment SphI-SalI du vecteur M13TG3845 (figure 3) est introduit dans le plasmide pTG3828 digéré par SphI et SalI pour donner le vecteur d'expression
15 pTG3864 (figure 5).

C. Construction du vecteur d'expression pTG3867

Pour supprimer complètement la séquence codant pour le précurseur du gène MF α 1 on effectue une mutagénèse dirigée sur M13TG3845 (figure 3) à
20 l'aide de l'oligonucléotide suivant :

5' GCCTCCCAAGTTTCAGCTATTACGTATACAGACTGC

pour obtenir le vecteur M13TG3846. Le fragment SphI-SalI de ce vecteur est introduit dans le plasmide pTG3828 (figure 4) digéré par SphI et SalI pour donner le vecteur d'expression pTG3867. Dans ce vecteur, la séquence XI et celle codant
25 pour rHV2Lys47 sont adjacentes. Pour obtenir la structure schématique de ce plasmide, il suffit sur la figure 5 de retirer la séquence "pro" déléetée de MF α 1.

D. Construction du vecteur d'expression pTG3894

Un site SmaI est créé dans la séquence codant pour le fragment "pro" du précurseur du facteur α par mutagenèse dirigée sur M13TG3841 (figure 2) grâce à l'oligonucléotide suivant :

5' TCCGCATTAGCTGCTCCCGGGAACACTACAACAGAA

pour obtenir M13TG3869. Ce vecteur est ensuite digéré par SphI et SmaI, le petit fragment est isolé et il est ligué au grand fragment SphI et SmaI de M13TG3845 (figure 3) pour donner le vecteur M13TG3891. Le fragment SphI-SalI de ce vecteur est introduit dans le plasmide pTG3828 (figure 4) ouvert aux sites SphI et SalI pour donner le vecteur d'expression pTG3894 qui comporte donc la séquence "pro" du précurseur du facteur α mutée. Pour obtenir la structure schématique de ce plasmide, il suffit sur la figure 5 de remplacer la séquence "pro" déléetée de MF α 1 par la séquence "pro" mutée.

15 E. Construction du vecteur d'expression pTG3884

La séquence XI est modifiée par mutagenèse dirigée sur M13TG3845 en utilisant l'oligonucléotide suivant :

5' GTTTCTCTACTACACTCGCTACTGC

La modification d'une seule base donne la séquence XII et induit le remplacement d'une valine par une leucine en tant qu'acide aminé R₄ du peptide signal. On obtient ainsi le bactériophage M13TG3846. Le fragment SphI-SalI de M13TG3846 est introduit dans le plasmide pTG3828 (figure 4) ouvert aux sites SphI et SalI pour donner le vecteur d'expression pTG3884 qui comporte :

- la séquence du gène URA3 déléetée de son promoteur (URA3-d),
- 25 - le promoteur du gène MF α 1, suivi d'un codon ATG, en tant que fragment a),
- la séquence XII en tant que fragment b),
- la séquence "pro" déléetée du gène MF α 1, suivi des codons codant pour Lys-

Arg, en tant que fragment b'),

- la séquence codant pour rHV2Lys47 en tant que fragment c),
- le terminateur du gène codant pour PGK de la levure.
- un fragment de pBR322,
- 5 - un fragment du plasmide 2 μ .

EXEMPLE 2 : Production de rHV2Lys47 dans le surnageant de culture en fonction du plasmide utilisé.

10 Une souche de levure de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* de génotype MAT α , ura3-251,-373,-328, leu2-3,-112, his3, pep4-3 est transformée par les plasmides pTG3864, pTG3867, pTG3894 et pTG3884 par la méthode de l'acétate de lithium [Ito, H. *et al.* J. Bactériol. (1983) 153: 163] et les prototrophes Ura+ sont sélectionnés. Ils sont ensuite mis en culture en erlenmeyer à 30°C sur un

15 milieu sélectif (0,7% de bases azotées pour levures (Yeast Nitrogen Base), 0,5% de casamino acides et 1% de glucose). Après 48 heures de culture, on sépare cellules et surnageant par centrifugation et l'activité inhibitrice de la thrombine est déterminée dans le surnageant en utilisant le test colorimétrique (activité

20 protéolytique sur un substrat synthétique, le chromozyme TH - Boehringer Mannheim). Le tableau I présente les résultats des dosages; chaque valeur correspond à la moyenne de deux expériences indépendantes. L'activité de rHV2Lys47 est exprimée en ATU/ml de surnageant.

Tableau I

	Plasmide	ATU/ml
5	pTG3894	40
	pTG3864	50
	pTG3867	130
	pTG3884	125

10 Dans tous les cas on mesure une activité anti-thrombine. La protéine rHV2Lys47 produite par la levure est donc excrétée dans le surnageant. De plus elle est sécrétée sous forme active. Les meilleurs résultats sont obtenus pour les souches transformées par pTG3884 et pTG3867.

15 Le contenu en protéine des surnageants est analysé par HPLC. Le pic majeur obtenu correspond bien à celui de rHV2Lys47 (sous sa forme à 65 acides aminés) et la détermination de la séquence N-terminale confirme l'obtention d'une molécule correctement synthétisée.

20 **EXEMPLE 3 :** Construction d'un vecteur d'expression de la défensine A d'insectes : pTG4826.

A. Synthèse d'une séquence d'ADN codant pour la défensine A d'insecte.

25 La synthèse se fait en deux blocs assemblés grâce à leurs extrémités cohésives KpnI. Le premier bloc comprend 3 oligonucléotides numérotés de 1 à 3 et le second bloc, 6 oligonucléotides numérotés de 4 à 9. Leur séquence et la position des oligonucléotides (dernière ligne du tableau; les ronds représentent la partie 5' de l'oligonucléotide) sont donnés dans le tableau II.

TABLEAU II

n°	Séquence
1	5' AGCTTGGACAAGAGAGCTACCTGTGACTTGTTGTCCGGTAC
2	5' GGTAGCTCTCTTGTCCA
3	5' CGGACAACAAGTCACA
4	5' CGGTATTAACCACTCCGCTTGTGCTGCTCACTGTTTGTTG
5	5' AGCACAAGCGGAGTGGTTAATACCGGTAC
6	5' AGAGGTAACAGAGGTGGCTACTGTAACGGTAAGGGTGT
7	5' AGTAGCCACCTCTGTTACCTCTCAACAAACAGTGAGC
8	5' TTGTGTTTGTAGAACTAAGGATCCG
9	5'AATTCCGGATCCTTAGTTTCTACAAACACAAACACCCTTACCGT TAC

15

La séquence obtenue est la suivante :

HindIII

+1

KpnI

10

20

10
AGC TTG GAC AAG AGA GCT ACC TGT GAC TTG TTG TCC GGT ACC
Ala Thr Cys Asp Leu Leu Ser Gly Thr

20

25

GGT ATT AAC CAC TCC GCT TGT GCT GCT CAC TGT TTG TTG AGA
Gly Ile Asn His Ser Ala Cys Ala Ala His Cys Leu Leu Arg

30

GGT AAC AGA GGT GGC TAC TGT AAC GGT AAG GGT GTT TGT GTT
 Gly Asn Arg Gly Gly Tyr Cys Asn Gly Lys Gly Val Cys Val

5 40 BamHI-EcoRI
 TGT AGA AAC TAA GGATCCG
 Cys Arg Asn

10 La synthèse du premier bloc utilise les oligonucléotides 4, 5, 6, 7, 8 et 9 et s'effectue de la façon suivante :

- les oligonucléotides 5, 6, 7 et 8 sont tout d'abord phosphorylés à leur extrémités 5' pour éviter la formation de polymères au cours de l'assemblage. Pour chacun de ces oligonucléotides, 100 picomoles sont traitées à la polynucléotide kinase, 2 unités dans un volume final de 20 µl de Tris HCl 60 µM à pH 7,5; 10 µM de MgCl₂; 8 µM de dithiothréitol (tampon de kination) 15 contenant 3,3 picomoles d'ATPy marqué avec ³²P (5000 Ci/mmmole). Après 15 minutes d'incubation à 37°C, 5 µmoles d'ATP non marqué sont ajoutées.
- après incubation à 37°C pendant 30 min. 75 picomoles des oligonucléotides 5, 6, 7 et 8 sont mélangés, chauffés à 95°C pendant 3 min., puis les 20 oligonucléotides 4 et 9 sont ajoutés dans un volume final de 90 µmoles de tampon de kination décrit ci-dessus. L'ensemble est chauffé à 95°C pendant 3 min. puis refroidi lentement en 2 heures à 37°C.
- 25 picomoles de ces oligonucléotides hybridés sont soumis au traitement par la 25 ligase T4 pendant une heure à 15°C. Ce mélange réactionnel (1 picomole) est ensuite ajouté à 50 ng du du bactériophage M13TG131 [Kieny M.P. *et al.* (1983) Gene 26, 91-99] traité par EcoRI et KpnI (1 heure à 15°C). Le mélange de ligation est utilisé pour transformer les cellules compétentes de la souche *E. coli* JM103 [Messing J. *et al.* (1981), Nucleic Acid Res. 9, 309]. Un clone présentant la séquence recherchée est isolé, il est appelé M13TG3821.

30 La synthèse du second bloc utilise les oligonucléotides 1, 2 et 3 et s'effectue selon la même procédure que celle décrite pour la synthèse du premier

bloc. Dans ce cas, seul l'oligonucléotide 2 est phosphorylé à son extrémité 5'.

Ce second bloc est cloné entre les sites HindIII et KpnI du bactériophage M13TG3821 et un clone portant la séquence d'ADN codant pour la défensine A (figure 5) est isolé, il est appelé M13TG3849.

5

B. Construction du plasmide d'expression de la défensine A: pTG4839.

Le fragment SphI - SmaI de 1045 paires de bases du bactériophage M13TG3846 décrit précédemment (Exemple 1, E.) est transféré dans le vecteur M13TG3869 décrit précédemment (Exemple 1, D.) préalablement digéré par SphI et SmaI. On obtient ainsi le vecteur M13TG4803 qui porte :

10

- le promoteur du gène MF α 1, suivi d'un codon ATG,
- la séquence XII,
- la séquence "pro" mutée du gène MF α 1 suivi des codons codant pour Lys-Arg,
- la séquence codant pour rHV2Lys47.

15

Afin de remplacer la séquence codant pour rHV2Lys47 par celle codant pour la défensine A d'insecte on introduit un site HindIII dans la séquence codant pour "pro" mutée de MF α 1 à l'aide de l'oligonucléotide de séquence :

5' GAAGGGGTAAGCTTGGATAAA

20

Puis on introduit le fragment HindIII - BamHI de M13TG3849 décrit précédemment (Exemple 3, A.) qui porte la séquence synthétique codant pour la défensine A dans ce vecteur préalablement traité par HindIII et BamHI pour éliminer la séquence codant pour rHV2Lys47.

25

Le fragment SphI-SalI de M13TG4813 est introduit dans le plasmide pTG3828 (figure 4) ouvert aux sites SphI et SalI pour donner le vecteur d'expression pTG4839 qui comporte :

- la séquence du gène URA3 déléetée de son promoteur (URA3-d),
- le promoteur du gène MF α 1, suivi d'un ATG,

- la séquence XII,
 - la séquence "pro" mutée du gène MF α 1 suivi des codons codant pour Lys-Arg,
 - la séquence synthétique codant pour la défensine A d'insectes,
 - le terminateur du gène codant pour PGK de la levure.
- 5
- un fragment de pBR322,
 - un fragment du plasmide 2 μ .

EXEMPLE 4 : Production de défensine A dans le surnageant de culture.

10 Une souche de levure de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* de génotype MAT α , ura3-251,-373,-328, leu2-3,-112, his3, pep4-3 est transformée par le plasmide pTG4839 par la méthode de l'acétate de lithium [Ito, H. *et al.* J. Bactériol. (1983) 153: 163] et les prototrophes Ura+ sont sélectionnés. Ils sont ensuite mis en culture en erlenmeyer à 30°C sur un milieu sélectif (0,7% de bases

15 azotées pour levures (Yeast Nitrogen Base), 0,5% de casamino acides et 1% de glucose). Après 48 heures de culture, on sépare cellules et surnageant par centrifugation et le surnageant est filtré sur un filtre de 22 μ puis passé sur cartouche Sep-Pak C18. Le matériel fixé est élué avec 60% d'acétonitrile, 0,1% d'acide trifluoro acétique dans de l'eau et séché sous vide. L'activité

20 antibactérienne de la défensine A est ensuite mise en évidence par un test d'étalement sur agar ou sur gélose ensemencé de germes bactériens (*Micrococcus luteus*) conformément à la procédure décrite par Lambert *et al.* (1989) PNAS 86: 262-266.

25 Dans le surnageant des levures transformées par le plasmide pTG4839 on détecte effectivement une activité antibactérienne. La protéine défensine A produite par la levure est donc excrétée dans le surnageant. De plus elle est secrétée sous forme active.

Le contenu en protéine des surnageants est analysé par HPLC. Le pic majeur obtenu correspond bien à celui de la défensine A d'insecte et la détermination de la séquence de la protéine confirme l'obtention d'une molécule correctement synthétisée.

REVENDECATIONS

1. Un fragment d'ADN isolé qui code pour un peptide dont la séquence d'acides aminés présente un degré d'homologie d'au moins 60% avec la séquence d'acides aminés de formule (I) ou (II)
- (I) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln et
- (II) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-Val-Ser-Ala.
2. Un fragment d'ADN selon la revendication 1 qui code pour un peptide dont la séquence d'acides aminés présente un degré d'homologie d'au moins 80% avec la séquence d'acides aminés (I) ou (II) de formule
- (I) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln et
- (II) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-Val-Ser-Ala.
3. Un fragment d'ADN selon la revendication 1 ou 2 qui code pour un peptide comprenant la séquence d'acides aminés (III)
- (III) $R_1-R_2-R_3$ -Thr-Thr- R_4 -Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-
1 5 10
Phe-Thr-Ala- R_5-R_6
15 19
- dans laquelle :
- R_1 est un acide aminé sélectionné parmi Arg et Lys,
 R_2 et R_6 sont chacun un acide aminé sélectionné de manière indépendante parmi Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr et Val

R₃ et R₅ sont chacun un acide aminé sélectionné de manière indépendante parmi Asp, Gly, Asn, Pro et Ser, et

R₄ est un acide aminé sélectionné parmi Val, Leu, Ala, Cys, Phe, Ile et Met.

- 5 4. Un fragment d'ADN selon la revendication 1 ou 2 qui code pour un peptide comprenant la séquence d'acides aminés (IV)

(IV) R₁-R₂-R₃-Thr-Thr-R₄-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-R₅-R₆-R₇

dans laquelle:

10 R₁ est un acide aminé sélectionné parmi Arg et Lys,

R₂ et R₆ sont chacun un acide aminé sélectionné de manière indépendante parmi Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr et Val

R₃ et R₅ sont chacun un acide aminé sélectionné de manière indépendante parmi Asp, Gly, Asn, Pro et Ser,

15 R₄ est un acide aminé sélectionné parmi Val, Leu, Ala, Cys, Phe, Ile et Met, et
R₇ est une séquence de protéolyse.

5. Un fragment d'ADN selon la revendication 4 dans lequel R₇ est une séquence de protéolyse R₈-R₉-R₁₀ dans laquelle:

20 R₈ est un acide aminé sélectionné parmi Ala, Val, Ser, Cys, Gly, Ile, Leu, Thr,

R₉ est un acide aminé sélectionné parmi Ala, Arg, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr et Val et

R₁₀ est un acide aminé sélectionné parmi Ala, Cys, Gly, Leu, Pro, Gln, Ser et Thr.

25

6. Un fragment d'ADN selon la revendication 1 ou 2 qui code pour un peptide comprenant une séquence d'acides aminés sélectionnée parmi les

séquences d'acides aminés (V) et (VI)

(V) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln;

5 (VI) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln.

7. Un fragment d'ADN selon l'une des revendications 1, 2, 4 et 5 qui code pour un peptide comprenant une séquence d'acides aminés sélectionnée parmi les séquences d'acides aminés de formule (VII) et (VIII)

10 (VII) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Leu-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-R₇

dans laquelle R₇ est une séquence de protéolyse;

(VIII) Arg-Phe-Ser-Thr-Thr-Val-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Leu-Phe-Phe-Thr-Ala-Ser-Gln-R₇

15 dans laquelle R₇ est une séquence de protéolyse.

8. Un fragment d'ADN selon la revendication 7 qui code pour un peptide comprenant une séquence d'acides aminés sélectionnée parmi les séquences d'acides aminés de formule (VII) et (VIII) dans lesquelles R₇ est Val-Ser-Ala.

20

9. Application d'un fragment d'ADN selon l'une des revendications 1 à 8, à titre de fragment d'ADN codant pour un peptide signal utile pour la sécrétion d'une protéine hétérologue par une cellule dans laquelle la protéine hétérologue est synthétisée.

25

10. Application d'un fragment d'ADN selon la revendication 9, caractérisé en ce que le fragment d'ADN code pour un peptide signal utile pour la sécrétion

d'une protéine hétérologue par une cellule de levure dans laquelle la protéine hétérologue est synthétisée.

11. Une cassette d'expression d'une protéine hétérologue comprenant au moins:
- 5 a) un fragment d'ADN comportant des signaux d'initiation de transcription et de traduction,
- b) un fragment d'ADN selon l'une des revendications 1 à 8 et,
- c) un fragment d'ADN codant pour la protéine hétérologue mature.
12. Une cassette selon la revendication 11 comprenant en outre un fragment d'ADN b') codant pour un fragment peptidique "pro".
13. Une cassette selon la revendication 12 comprenant un fragment d'ADN b') codant pour un fragment peptidique "pro" ayant pour séquence Ala Pro Gly Leu
- 15 Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Asp Lys Arg.
14. Une cassette selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisée en ce le fragment a) comporte un promoteur fonctionnel dans une cellule de levure et un
- 20 codon d'initiation de traduction ATG.
15. Une cassette d'expression selon l'une des revendications 11 à 14, caractérisée en ce que le fragment d'ADN c) code pour une hirudine.
16. Une cassette d'expression selon la revendication 15, caractérisée en ce que le fragment d'ADN c) code pour le variant hirudine rHV2Lys47.
- 25

17. Une cassette d'expression selon l'une des revendications 11 à 14, caractérisée en ce que le fragment d'ADN c) code pour une défensine d'insectes.
18. Une cassette d'expression selon la revendication 17, caractérisée en ce que
5 le fragment d'ADN c) code pour la défensine A.
19. Un vecteur plasmidique comprenant une cassette d'expression selon l'une des revendications 11 à 18.
- 10 20. Un vecteur plasmidique selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comporte en fragment du plasmide 2 μ de levure.
21. Un vecteur plasmidique selon la revendication 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il comporte, en tant que gène de sélection, le gène URA3 délété de son
15 promoteur.
22. Une cellule transformée par un vecteur plasmidique selon l'une des revendications 19 à 21 ou ayant intégré dans son génome une cassette d'expression selon l'une des revendications 11 à 18.
20
23. Une cellule de levure selon la revendication 22.
24. Un procédé de préparation d'une protéine hétérologue, caractérisé en ce que l'on cultive une cellule selon la revendication 22 ou 23 et, en ce que l'on récupère
25 la dite protéine dans le milieu de culture.
25. Un procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que la cellule est

une cellule de levure.

26. Un procédé selon la revendication 24 ou 25, caractérisé en ce que ladite protéine est une hirudine.

5

27. Un procédé selon la revendication 24 ou 25, caractérisé en ce que ladite protéine est une défensine d'insectes.

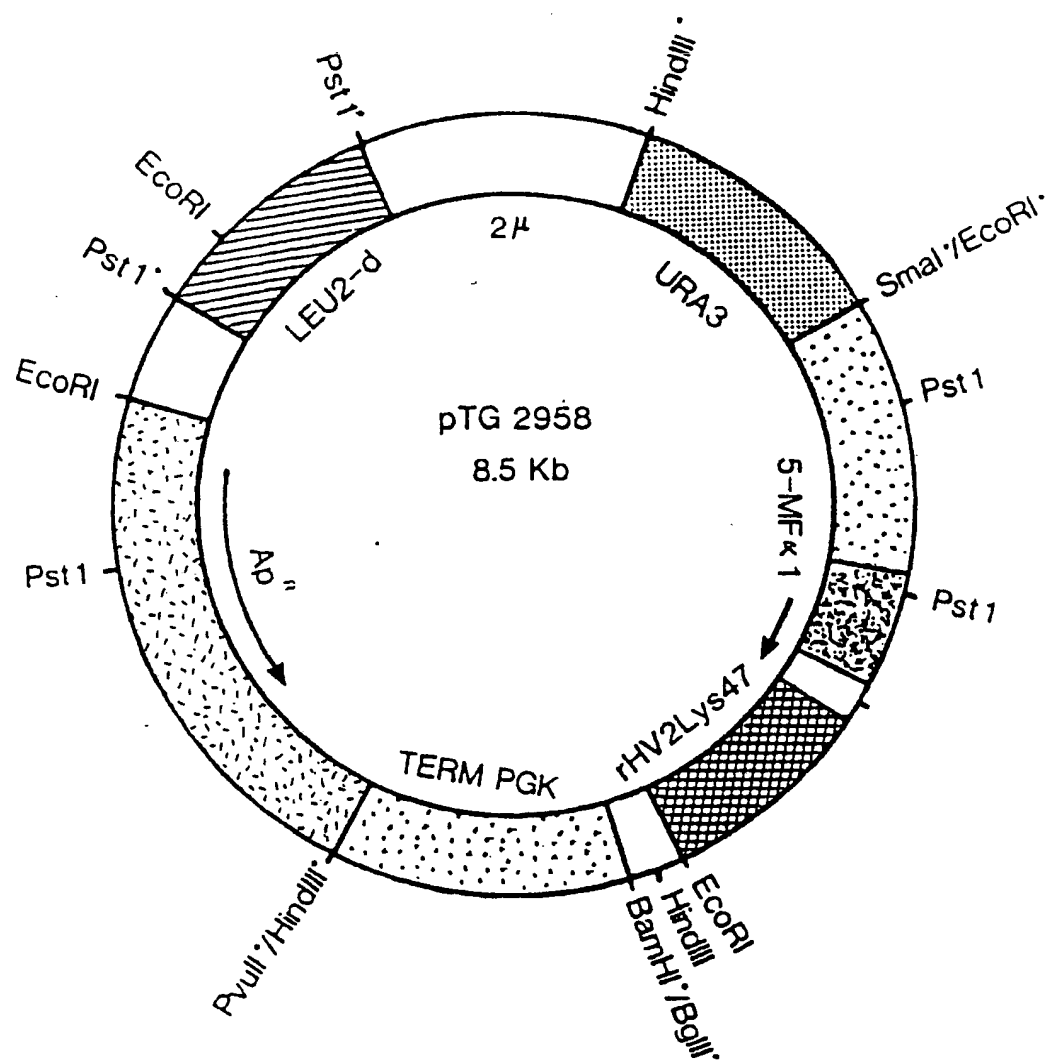
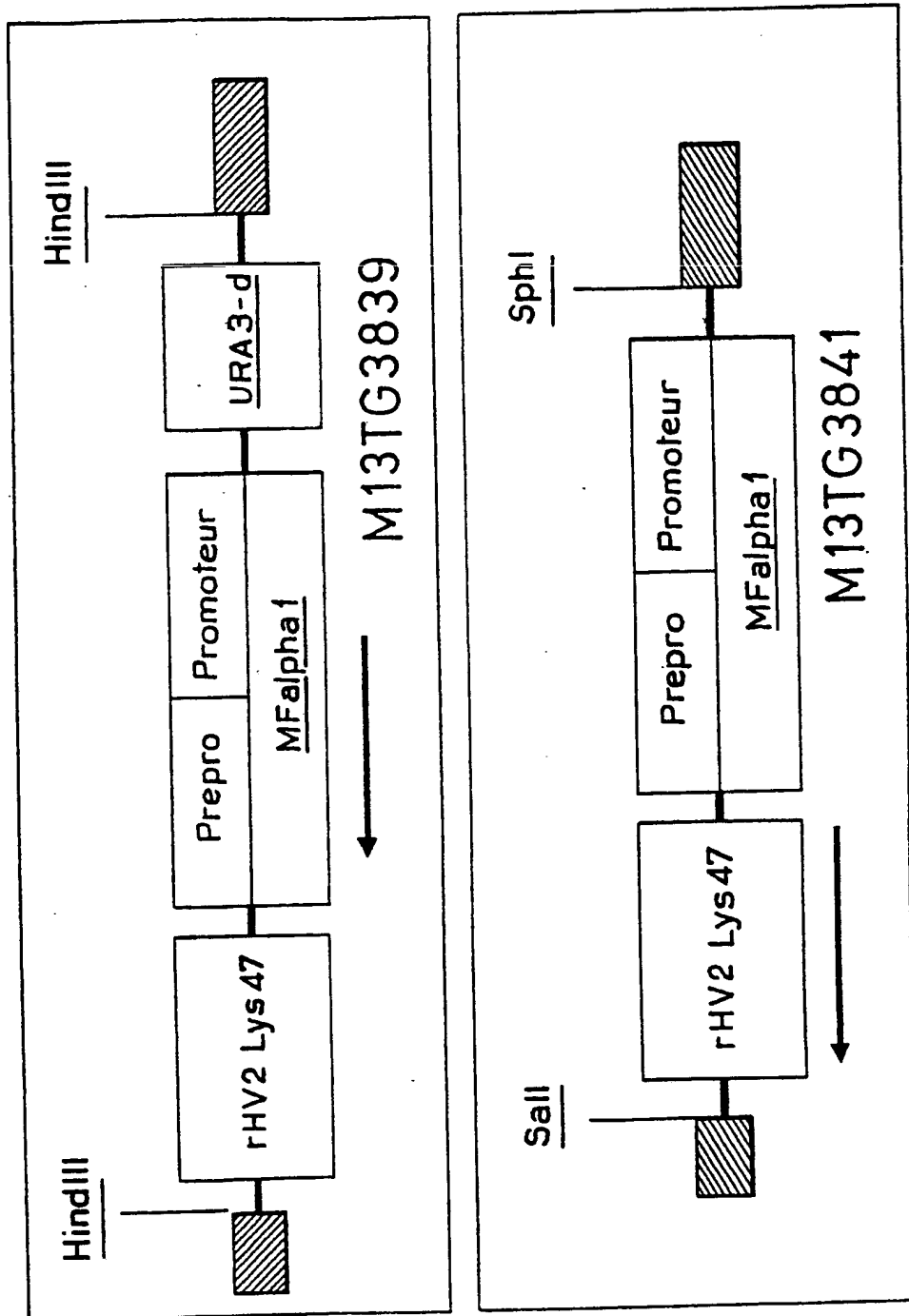
FIG. 1

FIG. 2



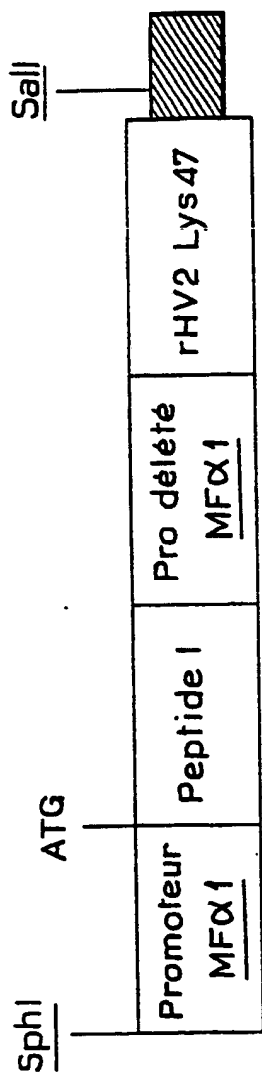


FIG. 3

M13TG3845

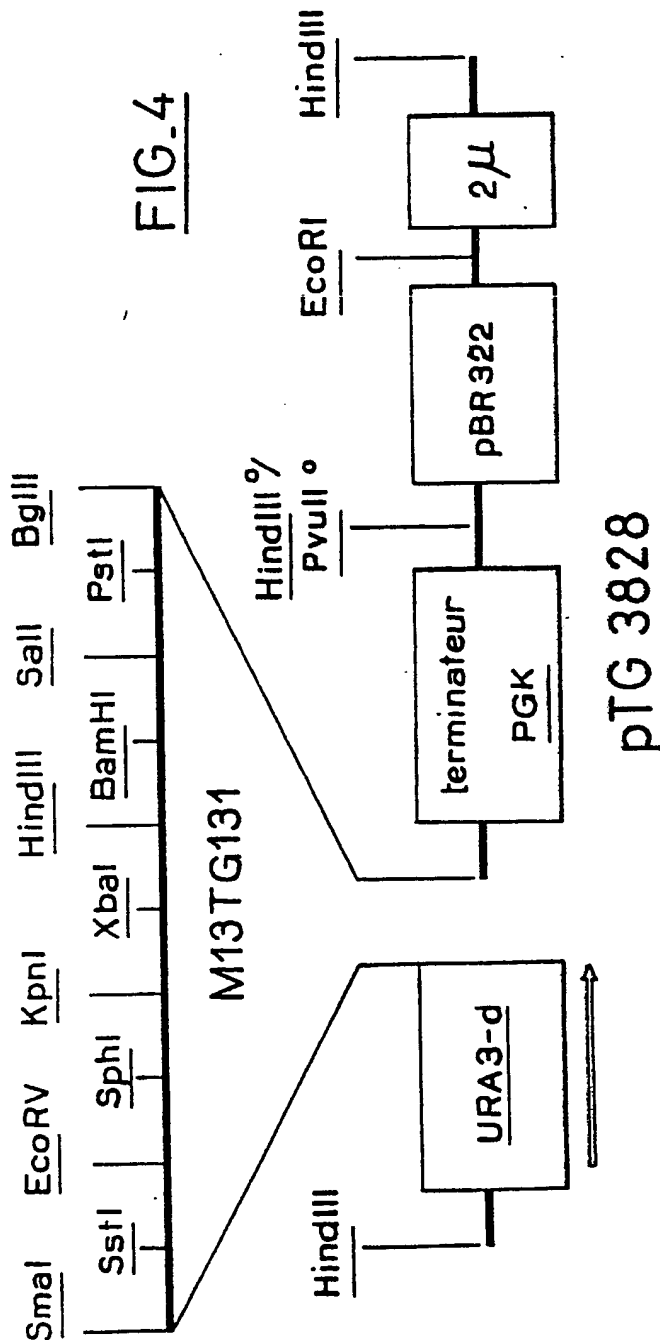
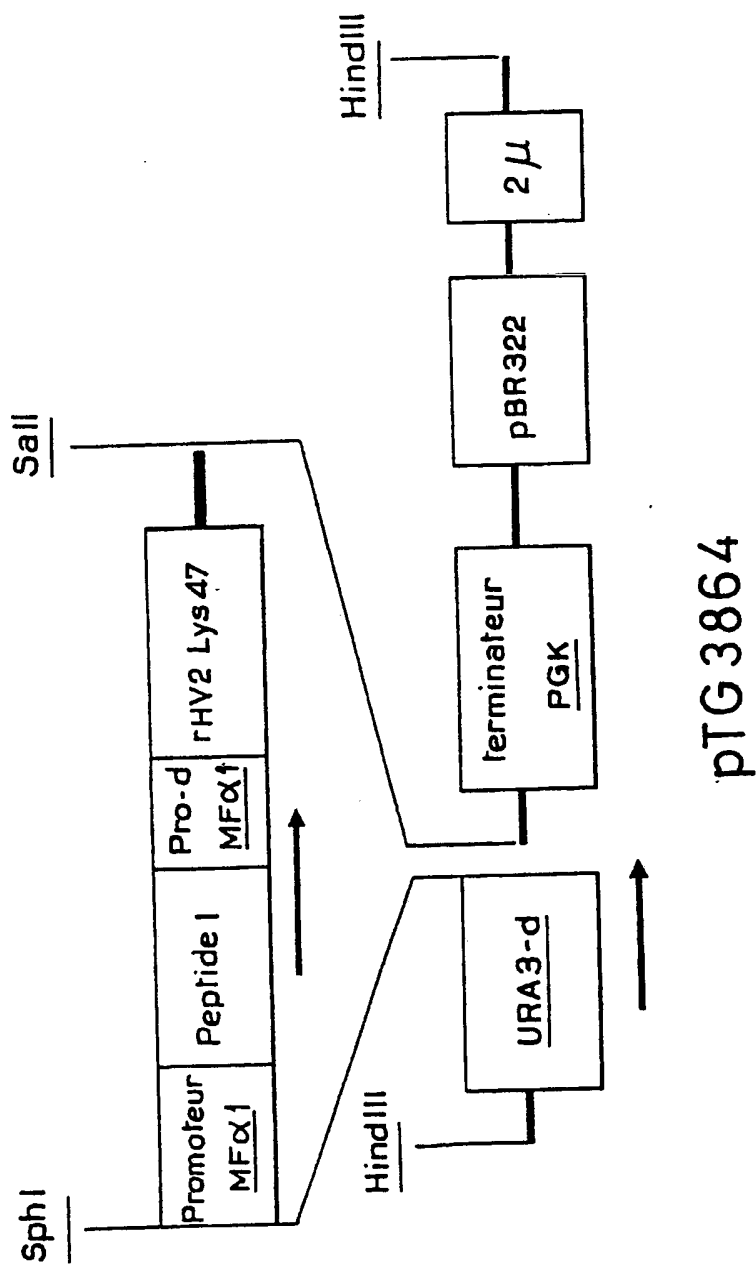


FIG. 4

pTG 3828

FIG. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 90/00306

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ C 12 N 15/15, C 12 N 15/62, C 07 H 21/04, C 07 K 13/00, C 12 P 12/00, // A 61 K 37/02, (C 12 N 15/15, C 12 R 1:865)		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	C 12 N 15/15, C 12 N 15/62, C 12 N 15/56, C 07 K 07/10	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	EP, A, 0252854 (TRANSGENE SA) 13 January 1988, see the whole document cited in the application ---	11-15,19-26
A	EP, A, 0273800 (TRANSGENE SA) 6 July 1988, see the whole document cited in the application ---	11-16,19-26
A	EP, A, 0158564 (TRANSGENE SA) 16 October 1985, see the whole document, in particular page 26, lines 8-19 ---	1,11,19,23-25
A	EP, A, 0225633 (CIBA-GEIGY AG) 16 June 1987, see abstract; page 17 ---	1,11-14
A	EP, A, 0200655 (TRANSGENE SA) 5 November 1986, see the whole document, in particular figure 2 cited in the application ---	1,11-14
		./-
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
03 August 1990 (03.08.90)	25 September 1990 (25.09.90)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
A	The Journal of Biological Chemistry, vol. 257, No. 24, 25 December 1982, American Society of Biological Chemists, Inc., (Baltimore, MD, US), J. Kaput et al.: "Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cytochrome c peroxidase precursor", pages 15054-15058 see abstract; page 15056, figure 4	1,9
P,A	EP, A, 0349451 (CNRS) 3 January 1990 see the whole document, in particular pages 493-498 et claim 2 cited in the application	17,28,27
P,A	Journal of Bacteriology, vol. 171, No. 11, November 1989, American Society for Microbiology, (Baltimore, MD, US), F. Klebl et al.: "Molecular cloning of a cell wall exo- β -1,3-glucanase from Saccharomyces cerevisiae", pages 6259-6264 see the whole article, in particular figure 6 cited in the application	1-8

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000306
SA 37090

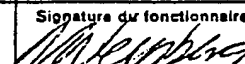
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 10/09/90
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0252854	13-01-88	FR-A- 2601383	15-01-88
		FR-A- 2607516	03-06-88
		AU-A- 7536687	14-01-88
		JP-A- 1085082	30-03-89
EP-A- 0273800	06-07-88	FR-A- 2607517	03-06-88
		AU-A- 8188087	02-06-88
		JP-A- 63152987	25-06-88
		ZA-A- 8709011	27-05-88
EP-A- 0158564	16-10-85	FR-A,B 2562088	04-10-85
		FR-A,B 2569420	28-02-86
		WO-A- 8504418	10-10-85
		JP-T- 61501609	07-08-86
EP-A- 0225633	16-06-87	AU-A- 6650486	18-06-87
		JP-A- 62208296	12-09-87
EP-A- 0200655	05-11-86	FR-A,B 2593518	31-07-87
		AU-A- 5778786	18-11-86
		WO-A- 8606406	06-11-86
		FR-A- 2601383	15-01-88
		JP-T- 62502661	15-10-87
EP-A- 0349451	03-01-90	FR-A- 2633296	29-12-89
		AU-A- 3674889	04-01-90
		JP-A- 2045498	15-02-90

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°

PCT/FR 90/00306

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : C 12 N 15/15, C 12 N 15/62, C 07 H 21/04, C 07 K 13/00, C 12 P 21/00, // A 61 K 37/02, (C 12 N 15/15, C 12 R 1:865)		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 12 N 15/15, C 12 N 15/62, C 12 N 15/56, C 07 K 07/10	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
A	EP, A, 0252854 (TRANSGENE SA) 13 janvier 1988 voir le document en entier cité dans la demande --	11-15, 19-26
A	EP, A, 0273800 (TRANSGENE SA) 6 juillet 1988 voir le document en entier cité dans la demande --	11-16, 19-26
A	EP, A, 0158564 (TRANSGENE SA) 16 octobre 1985 voir le document en entier, en particulier page 26, lignes 8-19 --	1, 11, 19, 23-25
A	EP, A, 0225633 (CIBA-GEIGY AG) 16 juin 1987 voir abrégé; page 17 --	1, 11-14
A	EP, A, 0200655 (TRANSGENE SA) 5 novembre 1986 ./.	1, 11-14
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« A » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
3 août 1990	25. 09. 90	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	 Natalie Weinberg	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		
(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	voir le document en entier, en particulier figure 2 cité dans la demande --	
A	The Journal of Biological Chemistry, volume 257, no. 24, 25 décembre 1982, American Society of Biological Chemists, Inc., (Baltimore, MD, US), J. Kaput et al.: "Nucleotide sequence of the yeast nuclear gene for cyto- chrome c peroxidase precursor", pages 15054-15058 voir abrégé; page 15056, figure 4 --	1,9
P,A	EP, A, 0349451 (CNRS) 3 janvier 1990 voir le document en entier, en particulier pages 493-498 et revendication 2 cité dans la demande - --	17,28,27
P,A	Journal of Bacteriology, volume 171, no. 11, novembre 1989, American Society for Microbiology, (Baltimore, MD, US), F. Klebl et al.: "Molecular cloning of a cell wall exo- β -1,3-glucanase from Saccharomyces cerevisiae", pages 6259-6264 voir l'article en entier, en particulier figure 6 cité dans la demande -----	1-8

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000306
SA 37090

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 10/09/90
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0252854	13-01-88	FR-A- 2601383	15-01-88
		FR-A- 2607516	03-06-88
		AU-A- 7536687	14-01-88
		JP-A- 1085082	30-03-89
EP-A- 0273800	06-07-88	FR-A- 2607517	03-06-88
		AU-A- 8188087	02-06-88
		JP-A- 63152987	25-06-88
		ZA-A- 8709011	27-05-88
EP-A- 0158564	16-10-85	FR-A, B 2562088	04-10-85
		FR-A, B 2569420	28-02-86
		WO-A- 8504418	10-10-85
		JP-T- 61501609	07-08-86
EP-A- 0225633	16-06-87	AU-A- 6650486	18-06-87
		JP-A- 62208296	12-09-87
EP-A- 0200655	05-11-86	FR-A, B 2593518	31-07-87
		AU-A- 5778786	18-11-86
		WO-A- 8606406	06-11-86
		FR-A- 2601383	15-01-88
		JP-T- 62502661	15-10-87
EP-A- 0349451	03-01-90	FR-A- 2633296	29-12-89
		AU-A- 3674889	04-01-90
		JP-A- 2045498	15-02-90

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82